



UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE
CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE
EN RECHERCHE AGRONOMIQUE
POUR LE DEVELOPPEMENT



Thèse présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE CORSE
Mention : Biochimie et Biologie Moléculaire

Soutenue publiquement par

Mourad Kamiri

le 22 février 2011

Biologie de la reproduction des hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes ; implication sur la structure génétique des populations d'hybrides générées dans les croisements diploïdes x tétraploïdes

Jury

Rapporteurs :

M Luis Navarro, Directeur de recherches, IVIA de Valencia - Espagne
M Abdelaziz Hmyène, Professeur, Université Hassan II Mohammedia - Maroc

Examineurs :

Mme Liliane Berti, Professeur, Université de Corse
M Felix Tomi, Professeur, Université de Corse

Directeur :

M Patrick Ollitrault, Chercheur HDR, CIRAD

Co-Directeur

M Yann Froelicher, Chercheur HDR, CIRAD

N°d'enregistrement au fichier central des thèses :

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été effectués au sein de l'unité CIRAD de L'INRA de San Giuliano. Nombreux sont ceux que je voudrais remercier pour m'avoir aidé, soutenu, accompagné et supporté pendant ces quatre années de thèse. C'est pour leur montrer ma gratitude et reconnaissance que je leurs dédie ces pages.

Je tiens à saluer ici les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la concrétisation de ce travail de thèse de doctorat. Ces remerciements sont rédigés dans un moment de doux relâchement intellectuel, sans véritable rigueur ni souci rédactionnel. J'ai laissé au hasard de ma mémoire, plus impressionnée par les événements récents, répétés, ou chargés d'émotions, le soin de retrouver ses personnes. Dans un autre état d'esprit, ces remerciements auraient certainement été tout autres, et j'aurais peut-être oublié un des noms qui suivent. Mais j'ai choisi ce moment précis pour les écrire.

Tout d'abord, j'exprime mes sincères remerciements à **Monsieur Tarek Kabbage**, Directeur du groupe Kabbage pour le soutien financier tout au long de ce travail de thèse me permettant, ainsi, de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions en Corse. Je tiens à lui rendre hommage pour sa confiance durant ces années de thèse.

Je souhaite remercier **Monsieur Ikbal Srairi**, Directeur des domaines Abbes Kabbage, pour sa confiance, sa présence, son accueil à chaque visite au Maroc et son soutien quasi inconditionnel durant ces années de thèse.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, **Monsieur Patrick Ollitrault**, Directeur de recherche à l'unité CIRAD de l'IVIA de Valence, Espagne, qui, au travers de son regard de maître dans l'art des agrumes, a su orienter mes recherches aux bons moments quand des difficultés se posaient. Malgré l'éloignement, il a toujours été disponible pour d'intenses et rationnelles discussions. Pour tout cela, sa confiance et son aide tout au long de la thèse, je le remercie vivement.

Je tiens tout particulièrement à remercier mon co-directeur de thèse, mon compagnon de route et mon ami, **Monsieur Yann Froelicher**, chargé de recherches HDR au sein de l'unité CIRAD de l'INRA de San Giuliano, pour avoir su me guider avec attention et gentillesse pendant la durée de cette thèse. Il m'a conduit sur la crête à la fois vertigineuse et passionnante de la recherche. Ses qualités scientifiques et humaines, son encouragement, ses remarques, ses critiques et sa présence ont largement contribué à l'aboutissement de cette thèse. Au travers de nos discussions, il m'a apporté une compréhension plus approfondie des divers aspects du sujet. Je salue aussi sa souplesse et son ouverture d'esprit qui ont su me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche. Qu'il trouve au travers de ces lignes l'expression de ma profonde gratitude et reconnaissance. Merci « Patron ».

Ma gratitude s'adresse aussi à **Mademoiselle Anne laure Fanciullino**, **Monsieur François Luro** et **Monsieur Jean Bouffin**. Tout d'abord pour leur accueil, mais surtout pour les nombreuses discussions que nous avons eu dans le domaine des agrumes, pour leurs conseils, scientifiques, techniques et pour leur aide et leur bonne humeur quotidienne. Je suis très reconnaissant à **Madame Bérengère Froelicher** et **Monsieur Jean Bouffin** de m'avoir fourni leurs conseils éclairés pour la correction de ce document.

J'adresse mes remerciements à **Monsieur Robert Domaingue**, directeur de l'unité de l'UR Amélioration génétique d'espèces à multiplication végétative pour m'avoir accueilli au sein de cette unité ainsi que **Madame Dominique Agostini**, Présidente du Centre INRA de Corse, et **Monsieur Olivier Pailly**, actuel Directeur de

l'Unité de Recherches GEQA pour m'avoir permis d'effectuer ce travail de recherche au sein de la Station de Recherches Agronomiques (SRA) de San Giuliano.

J'exprime mes sincères remerciements à **Monsieur Louis Navarro** et mon professeur, **Monsieur Abdelaziz Hmyène** pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail en acceptant à la fois de participer à mon jury de thèse et d'être les rapporteurs de ce travail. Merci également aux autres membres du jury pour l'honneur qu'il m'ont fait en acceptant de participer à mon jury de thèse: **Madame Liliane Berti** et **Monsieur Félix Tomi**.

Un travail de doctorat ne peut pas se faire seul. Une thèse est une expérience scientifique mais aussi humaine. J'ai eu la chance, alors que j'étais loin des miens, de travailler au sein d'une équipe chaleureuse, conviviale, amicale et accueillante. Pour ces années fort sympathiques, je remercie **Monsieur Gilles Costantino**, pour ses conseils techniques et pratiques en biologie moléculaire et pour résoudre les aléas de l'informatique mais surtout pour sa présence et sa longue patience tout au long de ce chemin doctoral. De même, je remercie notre papy local, **Monsieur Albert Dubois** qui m'a aidé à répondre à un certain nombre de questions pratiques, techniques, que je me suis posé, mais surtout pour sa joie de vivre et son café « Solide » matinal, Merci le vieux. Comment oublier **Monsieur François Varamo**, notre « Bill Gates » pour son aide rapide à chaque fois qu'un ordinateur me poussait à bout et **Madame Simone Riolacci**, pour son aide et sa gentillesse tout le long de ces années.

Quant à mes collègues thésards, Je tiens à exprimer mon profond respect et gratitude à : mon ami **Dr. Jean Baptiste Bassene**, pour son accueil à mon arrivée, pour ses encouragements et pour tout le temps que nous avons passé ensemble au labo comme au bâtiment social. Merci « Baily ». Ma compagne de route pendant des années, **Dr. Mouhaya Wafa**, pour plein de choses que je ne peux lister. A **Sajad Hussain**, pour son caractère sa cuisine et son accompagnement le long de ces années de thèse.

Sandrine Antoine et **Florine Poiroux**, grandes théophiles inséparables, qui ont relu attentivement tout ou partie de ce manuscrit. Merci du temps qu'elles ont consacré à redonner un peu de rigueur à ma plume qui a tendance quelques fois à déraiper... Le théoricien génial L. Boltzmann conseillait, à juste titre, de laisser le souci d'élégance aux tailleurs et aux cordonniers ; qu'il en soit donc ainsi. Je vous remercie aussi pour l'ensemble des moments qu'on a passé ensemble, en compagnie de Julien, tout au long de ces années. Et que ça dure (une petite pensée pour les raclettes à Julien).

Mes remerciements vont aussi à mes colocataires et amis. **Thibaut Poulet**, le dernier survivant, pour tous les pépins et fruits qu'on a partagé, les parties de PES où tu as râlé, tes plats minutieusement cuisinés. Merci gros. Une pensée aussi à l'ensemble des amis que j'ai eu la chance de connaître tout au long de cette thèse : Morgane, Marion, Vincent, Pierre Jean, Benoît, Cyril, Oussama, Caroline, Philippe, Arnaud, Alizée, Seydou, Galatée, Côme, Emna, Sandra et j'en oublie sûrement. Merci à tous vous êtes les « Best ».

Je remercie très sincèrement tout le personnel de la SRA de San Giuliano pour leur accueil chaleureux, leur générosité et leur bonne humeur au quotidien.

Pour être sûr de ne rien oublier, je remercie toute personne, végétal ou objet qui directement, indirectement, volontairement ou non, aurait contribué à cette thèse. On parle beaucoup de l'effet des battements d'ailes des papillons, mais on oublie souvent de remercier les dits papillons, car même si certains produisent des cyclones, d'autres ont des effets très positifs.

Je clos enfin ces remerciements en dédiant cette thèse de doctorat à mon père et ma mère qui ne sont ni plus ni moins que les auteurs de l'auteur. Je n'ai pas trouvé un mot, pas un seul, dans le dictionnaire pour exprimer ma reconnaissance et mon amour envers vous, mille milliards de Merci. Amal et Younes, je vous dédie aussi ce travail pour vous exprimer l'immense fierté et le bonheur que j'éprouve d'avoir une sœur et un frère tels que vous. A ma grand-mère chérie, Merci Lalla et à l'ensemble de ma petite famille.

Sommaire

I. Introduction..... 1

I.1 Histoire et contexte de la filière agrume 1

I.1.1 Origine et dispersion 1

I.1.2 Taxonomie et phylogénie 2

I.1.3 Contexte économique 5

I.1.3.1 Au niveau mondial 5

I.1.3.2 Au niveau du bassin méditerranéen 6

I.1.3.3 Au Maroc 7

I.1.4 Contraintes environnementales 8

I.1.5 Attentes du marché 9

I.1.6 Objectifs d'amélioration des agrumes 9

I.1.6.1 Généralités 9

I.1.6.2 Amélioration des porte-greffe 10

I.1.6.3 Amélioration variétale 11

I.1.6.4 Enjeux et perspectives de l'amélioration dans le bassin méditerranéen 11

I.1.6.5 Enjeux et perspectives de l'amélioration au Maroc 12

I.2 Contexte biologique de l'amélioration variétale des agrumes 12

I.2.1 Diversité phénotypique chez les agrumes 12

I.2.2 Ploïdie et cytogénétique des agrumes 14

I.2.3 Système de reproduction chez les agrumes 14

I.2.3.1 Généralités 14

I.2.3.2 Apomixie 15

I.2.3.2.1 Dans le règne végétal 15

I.2.3.2.2 Chez les agrumes 17

I.2.3.2.3 L'apomixie dans les programmes d'amélioration 18

I.2.3.2.3.1 Intérêts à l'amélioration de porte-greffe 18

I.2.3.2.3.2 Obstacles à l'amélioration variétale 19

I.2.3.2.4 Transmission de l'apomixie 19

I.2.3.2.5 Discrimination entre plants hybrides et nucellaires 20

I.2.3.3 Aspermie chez les agrumes 20

I.2.3.3.1 Aspermie au niveau diploïde 21

I.2.3.3.1.1 Stérilité mâle et femelle 21

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I.2.3.3.1.2 Autoincompatibilité..... | 22 |
| I.2.3.3.2 Cultivars triploïdes aspermes..... | 22 |
| I.2.3.3.3 Mécanismes de formation naturelle des triploïdes et tétraploïdes spontanés chez les agrumes..... | 23 |
| I.3 Stratégie d'amélioration des petits agrumes : la voie triploïde | 25 |
| I.3.1 Intérêt des cultivars triploïdes | 25 |
| I.3.2 Obtention de tétraploïdes pour les croisements interploïdaux 2x X 4x et 4x X 2x | 26 |
| I.3.2.1 Polyploïdes issus de biotechnologies..... | 26 |
| I.3.2.1.1 Colchicine..... | 26 |
| I.3.2.1.2 Hybridation somatique..... | 26 |
| I.3.2.1.2.1 Hybrides somatiques allotétraploïdes..... | 28 |
| I.3.2.1.2.2 Cybrides | 29 |
| I.3.2.1.2.3 Hybrides aneuploïdes | 29 |
| I.3.3 Stratégies pour la création de triploïdes aspermes..... | 29 |
| I.3.3.1 Sélection de triploïdes spontanés lors des croisements entre diploïdes | 30 |
| I.3.3.2 Croisements entre diploïdes et autotétraploïdes..... | 30 |
| I.3.3.3 Croisements entre diploïdes et hybrides somatiques tétraploïdes..... | 30 |
| I.3.3.4 Hybridation somatique entre des protoplastes diploïdes et haploïdes..... | 31 |
| I.4 Polyploïdie chez les plantes supérieures | 31 |
| I.4.1 Généralités..... | 31 |
| I.4.2 Origine et maintien des polyploïdes | 31 |
| I.4.3 Biologie de la reproduction et ségrégation chez les polyploïdes..... | 33 |
| I.4.3.1 Classification des polyploïdes..... | 33 |
| I.4.3.2 Comportement méiotique..... | 33 |
| I.4.3.2.1 Chez les polyploïdes naturels | 33 |
| I.4.3.2.2 Chez les hybrides somatiques..... | 34 |
| I.4.3.3 Fertilité..... | 35 |
| I.4.3.3.1 Chez les polyploïdes naturels | 35 |
| I.4.3.3.2 Chez les hybrides somatiques..... | 35 |
| I.4.3.4 Ségrégation allélique..... | 36 |
| I.4.3.4.1 Modèles de ségrégation | 36 |
| I.4.3.4.2 Ségrégation chez les hybrides somatiques..... | 38 |
| I.4.3.4.3 Transmission de l'hétérozygotie..... | 39 |
| I.4.4 Polyploïdes et expression génotypique et phénotypique..... | 39 |
| I.4.4.1 Polyploïdisation et modifications génétiques..... | 40 |
| I.4.4.2 Polyploïdisation et modifications épigénétiques..... | 40 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I.5 Comportement méiotique et expression génomique et phénotypique chez les hybrides somatiques d'agrumes..... | 41 |
| I.5.1 Comportement méiotique des hybrides somatiques d'agrumes | 41 |
| I.5.2 Expression génomique et phénotypique chez les hybrides somatiques d'agrumes..... | 42 |
| II. Objectifs de la thèse..... | 44 |
| III. Matériels et Méthodes..... | 46 |
| III.1 Matériel végétal..... | 46 |
| III.2 Méthodes..... | 47 |
| III.2.1 Croisements contrôlés..... | 47 |
| III.2.1.1 Extraction des pépins et mise en culture des embryons | 48 |
| III.2.1.2 Sauvetage d'embryons | 48 |
| III.2.2 Caractérisation génétique du matériel végétal | 48 |
| III.2.2.1 Evaluation de la ploïdie | 48 |
| III.2.2.1.1 Cytométrie en flux | 48 |
| III.2.2.1.2 Comptage chromosomique..... | 49 |
| III.2.2.2 Caractérisation moléculaire des hybrides somatiques et des descendances | 49 |
| III.2.2.2.1 Extraction d'ADN | 49 |
| III.2.2.2.2 Amplification des ADN par PCR avec des amorces non marquées..... | 50 |
| III.2.2.2.3 Marqueurs SSR nucléaires..... | 50 |
| III.2.2.2.4 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide | 50 |
| III.2.2.2.5 Electrophorèse capillaire..... | 51 |
| III.2.3 Biologie de la reproduction des hybrides somatiques d'agrumes..... | 51 |
| III.2.3.1 Description des fleurs..... | 52 |
| III.2.3.2 Evaluation de la germination pollinique..... | 52 |
| III.2.3.3 Evaluation de la taille et la viabilité pollinique des hybrides somatiques et de leurs parents diploïdes..... | 52 |
| III.2.3.4 Evaluation de l'apomixie et de la fertilité femelle des hybrides somatiques et de leurs parents diploïdes..... | 53 |
| III.2.4 Etude cytogénétique et de la ségrégation allélique chez les hybrides somatiques d'agrumes | 53 |
| III.2.4.1 Etude de la méiose..... | 53 |
| III.2.4.2 Etude de la ségrégation allélique chez les hybrides somatiques | 54 |
| III.2.4.2.1 Modèle de formation des gamètes..... | 54 |
| III.2.4.2.2 Analyse des données observées | 56 |
| III.2.5 Analyse statistique | 58 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| IV. Résultats et discussion..... | 59 |
| IV.1 Etude de la transmission des caractères liés à la biologie de la reproduction chez les hybrides somatiques d'agrumes | 59 |
| IV.1.1 Résumé de l'article..... | 59 |
| IV.1.2 Article..... | 61 |
| IV.2 Origines génétiques des variations de ploïdie dans les descendance de croisements de type 2x X 4x impliquant des hybrides somatiques d'agrumes..... | 91 |
| IV.2.1 Résumé de l'article..... | 91 |
| IV.2.2 Article..... | 92 |
| IV.3 Etude de la ségrégation allélique chez un hybride somatique interspécifique entre <i>Citrus reticulata</i> et <i>Citrus lemon</i> | 124 |
| IV.3.1 Résumé de l'article..... | 124 |
| IV.3.2 Article..... | 125 |
| IV.4 Etude de la ségrégation allélique chez un hybride somatique intergénérique entre <i>Citrus reticulata</i> et <i>Poncirus trifoliata</i> | 153 |
| IV.4.1 Résumé de l'article..... | 153 |
| IV.4.2 Article..... | 154 |
| V. Discussion générale..... | 186 |
| V.1 Biologie de la reproduction des hybrides somatiques d'agrumes..... | 186 |
| V.1.1 Contributions parentales à l'élaboration du système de reproduction de l'hybride somatique et plus généralement au phénotype. | 186 |
| V.2 L'origine génétique des plantes présentant différents niveaux de ploïdie issues de croisements entre diploïdes et hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes..... | 190 |
| V.3 Etude de la ségrégation allélique chez un hybride somatique interspécifique WLM+EUR et un hybride somatique intergénérique WLM+PON d'agrumes..... | 192 |
| V.3.1 Les différents modes de ségrégation allélique chez les hybrides somatiques..... | 192 |
| V.3.2 L'effet de l'hybridation somatique sur le comportement méiotique..... | 193 |
| V.3.3 L'identification du mode de ségrégation allélique chez les hybrides somatiques interspécifiques et intergénériques d'agrumes..... | 194 |
| V.3.4 Impact du type d'hybridation somatique sur la transmission de l'hétérozygotie et la double réduction | 196 |
| VI. Conclusions et perspectives..... | 199 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| VI.1 Biologie de la reproduction des hybrides somatiques d'agrumes | 199 |
| VI.1.1 Effets de l'hybridation somatique sur l'appareil floral..... | 199 |
| VI.1.2 Impact de l'hybridation somatique sur la fertilité | 200 |
| VI.1.3 Transmission de l'apomixie et de la poly-monoembryonie | 200 |
| VI.2 Origine génétique des 2x, 3x et 4x dans les descendances 2x x 4x..... | 201 |
| VI.2.1 Perspectives pour les programmes d'amélioration d'agrumes | 201 |
| VI.3 Etude de la ségrégation allélique chez les hybrides somatiques d'agrumes..... | 203 |
| VI.3.1 Analyse cytogénétique et étude du mode de ségrégation allélique | 203 |
| VI.3.2 Perspectives d'études génétiques et épigénétiques chez les hybrides somatiques d'agrumes et leurs descendances..... | 204 |
| <i>VII. Références bibliographiques</i> | <i>207</i> |

Tables des figures

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1: Origine et dispersion des agrumes à travers le monde, Ollitrault <i>et al.</i> (2003) | 1 |
| Figure 2: Taxonomie des Aurantioideae, d'après Swingle et Reece (1967) | 3 |
| Figure 3: Principales régions productrices d'agrumes pour le marché du fruit frais et la transformation, (Imbert 2008) | 6 |
| Figure 4: Occupation de l'espace agricole et performances des filières de production au Maroc, plan Maroc Vert 2009 | 8 |
| Figure 5: Diversité pomologique des fruits d'agrumes : A = les cédrats ; B = les pomelos ; C = les oranges ; D = les limes ; E = les mandarines et F = les citrons. | 13 |
| Figure 6: Principales voies de l'apomixie, Spielman <i>et al.</i> (2003) | 16 |
| Figure 7: Graine polyembryonnée de <i>Poncirus trifoliata</i> | 18 |
| Figure 8: Schéma de déroulement de la FDR, la SDR et de la méiose normale dans une cellule mère, Cai et Xu (2007) | 25 |
| Figure 9: Produits de la fusion de protoplastes d'après Ollitrault <i>et al.</i> (2000) | 28 |
| Figure 10: Les différents modes de ségrégation allélique chez un tétraploïde | 37 |
| Figure 11: Arbres des hybrides somatiques plantés au champs à la station de recherche de San Giuliano ; a : Hybride somatique WLM+EUR. b : hybride somatique WLM+PON | 46 |
| Figure 12: Bourgeons floraux de WLM+EUR prélevés pour l'étude cytogénétique de cet hybride somatique | 54 |

1^{er} Article:

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1: Electropherograms of mCrCIR07D06 loci and PCR based dosage effects of allele copy number in WLM, SRG, WLM+SRG, 6x, 3x and 2x hybrids issued from open pollination of WLM+SRG somatic hybrid | 89 |
| Figure 2: Electropherograms of mCrCIR02D11 loci and PCR based dosage effects of allele copy number in WLM, SHO, WLM+SHO, 6x and 3x Hybrids issued from open pollination of WLM+SHO somatic hybrid | 90 |

2^{ème} Article:

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1: Flow cytometer analysis of 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained Citrus nuclei | 119 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 2: Tetraploid somatic hybrids and fusion parents pollen stainability (20x): micropollen grains are observed in WLM+SRG (arrows) | 120 |
| Figure 3: Mitotic chromosome counts from young leaves preparation of tetraploids and diploid samples from the progeny of FOM x WLM+SRG cross. a and b : 36 and 18 chromosomes are counterstained, respectively, with DAPI | 121 |
| Figure 4: Chromatographs of 4 SSR markers detected in parents (FOM, WLM, SRG, WLM+SRG somatic hybrid) | 122 |
| Figure 5: Chromatographs of an SSR marker detected in parents and the interploidal progeny | 123 |

3ème Article:

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1: Microsporogenesis in the tetraploid Willow Leaf mandarin+ Eureka lemon somatic hybrid | 149 |
| Figure 2: Mitotic chromosome counts from young leaf preparation of a progeny sample of CHA x WLM+EUR genotype (3x) | 150 |
| Figure 3: Deviance (fit) of 3 observed SSR loci (with no null alleles) segregation in Willow Leaf mandarin+ Eureka lemon somatic hybrid to inheritance models ranging from $\tau=0$ (full disomic) to $\tau=1$ (full tetrasomic) | 151 |
| Figure 4: Deviance (fit) of 3 observed SSR loci (with null alleles) segregation in Willow Leaf mandarin+ Eureka lemon somatic hybrid to inheritance models ranging from $\tau=0$ (full disomic) to $\tau=1$ (full tetrasomic) | 152 |

4ème Article:

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1: Ploidy evaluation of Chandler pummelo x (Willowleaf mandarin + Pomeroy Poncirus) progeny | 182 |
| Figure 2: Deviance (fit) of 4 observed SSR loci segregation in WLM+PON somatic hybrid to inheritance models ranging from $\tau=0$ (full disomic) to $\tau=1$ (full tetrasomic) | 183 |
| Figure 3: Interparental heterozygosity transmission rate in 16 SSR segregating intermediately with homologous preferential pairing in CHA X WLM+PON triploid progeny | 184 |
| Figure 4: Distribution of genetic dissimilarities between diploid gametes of WLM+PON somatic hybrid based on intergeneric segregation (a) and all alleles segregation (b) | 185 |

Liste des tableaux

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1: Les hybrides somatiques allotétraploïdes ainsi que leurs origines nucléaire et cytoplasmique et leurs parents diploïdes_____ | 47 |
| Tableau 2: Croisements ayant servi de support à l'étude de l'origine des variations de ploïdie dans les descendance_____ | 47 |

1er Article:

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1: Studied tetraploid citrus somatic hybrids and them diploid fusion parents_____ | 83 |
| Table 2: Characteristics of selected SSR markers used for nucellar/zygotic hybrids detection in somatic hybrids and diploid fusion parents seedlings_____ | 84 |
| Table 3: Flower characteristics of studied somatic hybrids and their diploid fusion parents_____ | 85 |
| Table 4: Percentage of micropollen formed and pollen fertility and size of studied somatic hybrids and its fusion parents_____ | 86 |
| Table 5: Average seed number and embryo number per seed in somatic hybrids and its diploid fusion parents_____ | 87 |
| Table 6: Ploidy and percentage of zygotics in somatic hybrids and parents seedlings_____ | 88 |

2ème Article:

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Table 1: Characteristic of SSR markers used for FOM X WLM+SRGEUR X SRG+COC and EUR X MEL+SHO progenies molecular study_____ | 112 |
| Table 2: Percentages of micropollen, pollen stainability. germinability and size of the three studied somatic hybrids and their fusion parents_____ | 114 |
| Table 3: Seed set and development in the three 2x X 4x crosses_____ | 115 |
| Table 4: Allelic configuration of a triploid and the 5 tetraploid plantlets obtained in the progeny of FOM X WLM+SRG progeny at 9 loci_____ | 116 |
| Table 5: Allelic configuration of diploid plantlets obtained in FOM X WLM+SRG progeny at 14 loci localized in 8 linkage groups in a Clementine map_____ | 117 |
| Table 6: Allelic configuration of diploid and tetraploid plantlets obtained in EUR X SRG+COC and EUR X MEL+SHO at 5 loci each_____ | 118 |

3ème Article:

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Table 1: Chromosome configuration at meiosis in microsporocytes of Willow Leaf mandarin+ Eureka lemon somatic hybrid_____ | 143 |
| Table 2: Characteristics of selected SSR markers used for Willow Leaf mandarin+ Eureka lemon somatic hybrid allelic inheritance study_____ | 144 |
| Table 3: Distribution of expected genotypes in the CHA X WLM+EUR progeny at the 17 studied loci_____ | 145 |
| Table 4: Genetic characterization of Eureka lemon (<i>C. limon</i>) and its presumed parents <i>C. aurantium</i> , <i>C. medica</i> and a DNA mixture with equal amounts of <i>C. aurantium</i> , <i>C. medica</i> DNAs using distorted SSR markers_____ | 147 |
| Table 5: Fitting inheritance model and rates of intraparental and interparental heterozygosity on segregation of 7 SSR loci with no null alleles in CHA x WLM+EUR triploid progeny_____ | 147 |
| Table 6: Fitting inheritance model and rates of intraparental and interparental heterozygosity on segregation of 10 SSR loci with null alleles in CHA x WLM+EUR triploid progeny____ | 148 |

4ème Article:

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Table 1: Characteristics of selected SSR markers used for Willowleaf mandarin+ Pomeroy <i>Poncirus</i> somatic hybrid (WLM+PON) allelic inheritance study_____ | 175 |
| Table 2. Distribution of observed genotypes in the Chandler pummelo x (Willowleaf mandarin + Pomeroy <i>Poncirus</i>) progeny at the 19 studied loci_____ | 177 |
| Table 3: Fitting inheritance model and rates of intraparental and interparental heterozygosity on segregation of 16 SSR loci in CHA X WLM+PON triploid progeny_____ | 180 |
| Table 4: Observed and estimated double reduction rates per locus for WLM+PON produced gametes_____ | 181 |

Liste des abréviations

ABA: acide abscissique
ADN: acide désoxyribonucléique
AFLP: amplified fragment length
ARN: acide ribonucléique
cDNA: ADN complémentaire
CHA: pamplemoussier chandler
CMS: cytoplasmic male sterile
COC: cédratier de Corse
DAPI: di aminido phenyl indol
dNTP: Désoxynucléotides triphosphate
EDTA: ethylenedinitro tetra acetic acid
EUR: citronnier Eureka
FDR: first division restitution
FISH: fluorescence in situ hybridization
GISH: genomic in situ hybridization
IPGRI: international plant genetic resources institute
ISSR: inter simple sequence repeats
MATAB: mixed alkyl trimethyl ammonium bromide
MEL: limettier mexicain
MSAP: methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism
PCR: polymerase chain reaction
PON: poncirus pomey
PVP: poly vinyl pyrrolidone
QTL: quantitative trait loci
RAPD: randomly amplified polymorphic
RFLP: restriction fragment length polymorphism
RLGSM: random landmark genomic scanning for methylation
SDR: seconde division restitution
SHO: oranger shamouti
SRG: pomelo star ruby
SSCP: single strand conformational polymorphism
SSR: simple sequence repeats
WLM: mandarinier Willowleaf

I. INTRODUCTION

I.1 HISTOIRE ET CONTEXTE DE LA FILERE AGRUME

I.1.1 Origine et dispersion

L'aire d'origine supposée des agrumes est le sud-est asiatique, allant des zones tropicales et subtropicales du sud de la Chine, au nord-est de l'Inde, en descendant jusqu'à l'Australie (Gmitter et Hu 1990). Cependant, l'origine géographique exacte des agrumes n'est toujours pas clairement identifiée. Les oranges seraient originaires de Chine, le cédrat et les citrons, des Indes. La route de la soie et la navigation côtière en Extrême-Orient ont permis des transferts réciproques d'agrumes entre l'Inde et la Chine. La navigation dans le golfe Persique a continué la diffusion ultérieure vers le Moyen-Orient, relayée par les conquêtes des mondes grec, latin et arabe.

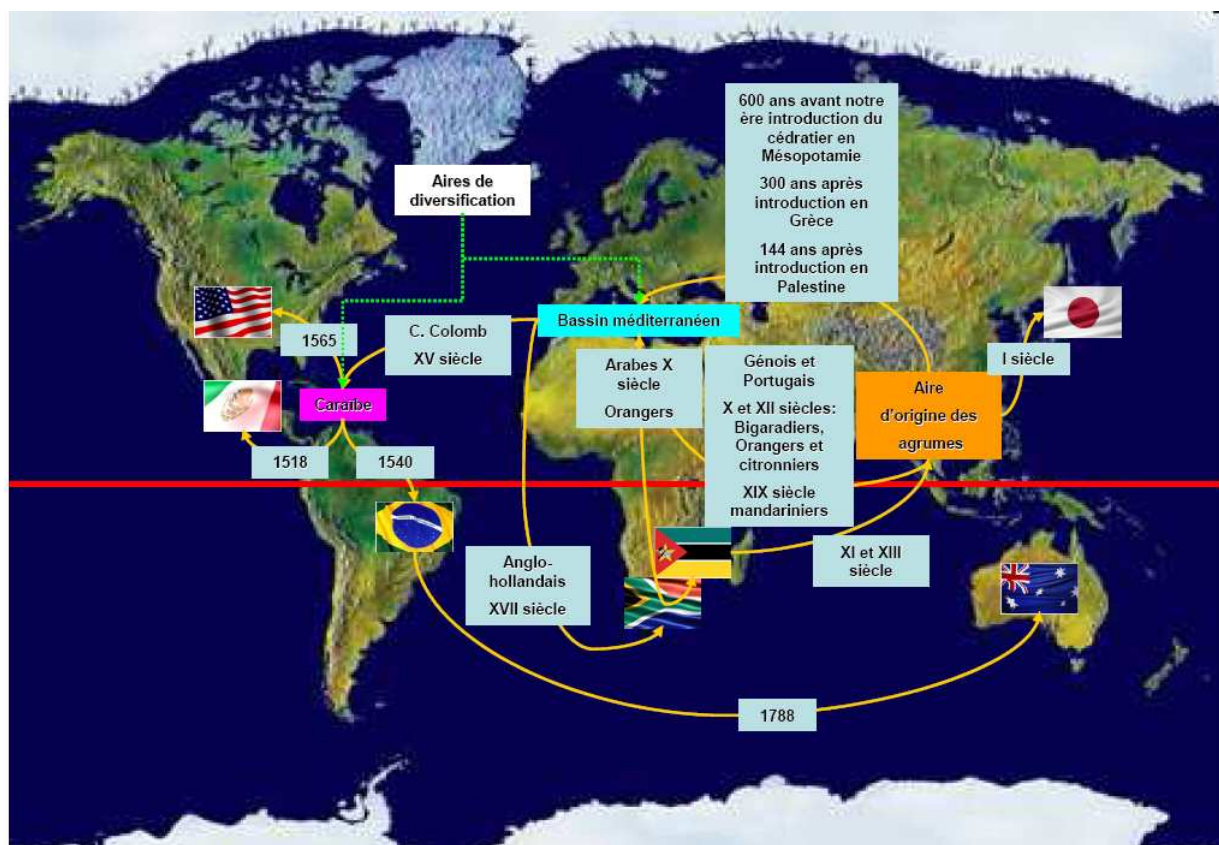


Figure 1: Origine et dispersion des agrumes à travers le monde, Ollitrault *et al.* (2003)

Ainsi, les agrumes ont été introduits dans le bassin méditerranéen durant l'Antiquité (Figure 1). D'après Tolkowsky (1938), le cédratier, le bigaradier, le bergamotier ont été ramenés sur

les bords de la Méditerranée lors des conquêtes par Alexandre le Grand en Perse et en Inde en 330 avant J-C. De nombreuses mosaïques dans les villas romaines, en particulier à Pompéi représentent ces agrumes. La fameuse pomme d'or du mythique Jardin des Hespérides n'est probablement autre qu'un cédrat. Les autres agrumes arriveront plus tard au gré des invasions arabes (XI^e siècle après JC) qui les diffusèrent sur une partie de l'Europe et en Afrique. Quant aux oranges douces, il faut attendre le début du XVI^e siècle et leur introduction par les navigateurs portugais, dont Vasco de Gama, pour qu'elles soient connues et se répandent. Enfin, la première mandarine n'arrive en Europe qu'au début du XIX^e siècle. Les agrumes, introduits en Amérique suite aux voyages de Christophe Colomb, donnent naissance au pomelo, l'unique espèce non originaire d'Asie. L'Australie sera le dernier continent à accueillir les agrumes cultivés en 1788 en provenance du Brésil.

I.1.2 Taxonomie et phylogénie

Les agrumes font partie des Rutaceae, l'une des 21 familles qui composent l'ordre des Geraniales. Les Rutaceae comprennent 1600 espèces et 150 genres regroupés en 7 sous familles et 12 tribus. Le terme « agrumes vrais », selon Swingle et Reece (1967), regroupe six genres sexuellement compatibles de la famille des Rutaceae, sous famille des Aurantioideae, tribu des Citreae. La majorité des espèces cultivées appartiennent au genre *Citrus* (Figure 2). Deux autres genres contiennent également des espèces consommées. Le genre *Fortunella* rassemble deux à sept espèces selon les auteurs (Rahman et Nito 1994; Swingle 1915). Leurs fruits sont connus sous le nom de kumquats. Le genre *Microcitrus* rassemble sept espèces, *M. australis*, *M. australasica*, *M. inodora*, *M. garrowayii*, *M. maideniana*, *M. warburgiana* et *M. papuana* (Swingle et Reece 1967; Winters 1976). Les deux dernières espèces sont originaires de Papouasie-Nouvelle-Guinée alors que les autres sont natives d'Australie. Longtemps consommés après cueillette par les Aborigènes, les fruits de *Microcitrus australasica*, également appelés lime digitée d'Australie, sont cultivés et commercialisés depuis quelques années. Le genre *Poncirus*, renferme une unique espèce, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., caractérisée par des feuilles caduques et trifoliées. Elle est utilisée comme porte-greffe du fait de ses nombreuses résistances aux contraintes biotiques et elle est caractérisée par des fruits non comestibles. *Eremocitrus glauca*, également appelée lime du désert australien, est la seule espèce du genre *Eremocitrus*. C'est une espèce endémique des régions semi-arides du Queensland, de Nouvelles-Galles-du-Sud et d'Australie-Méridionale en Australie. Enfin, le genre *Clymenia*, longtemps considéré comme monospécifique, comporte deux espèces : *C.*

polyandra et *C. platypoda* (Stone 1985). Ce genre diffère des *Citrus* par son feuillage et la taille réduite de ses arbres.

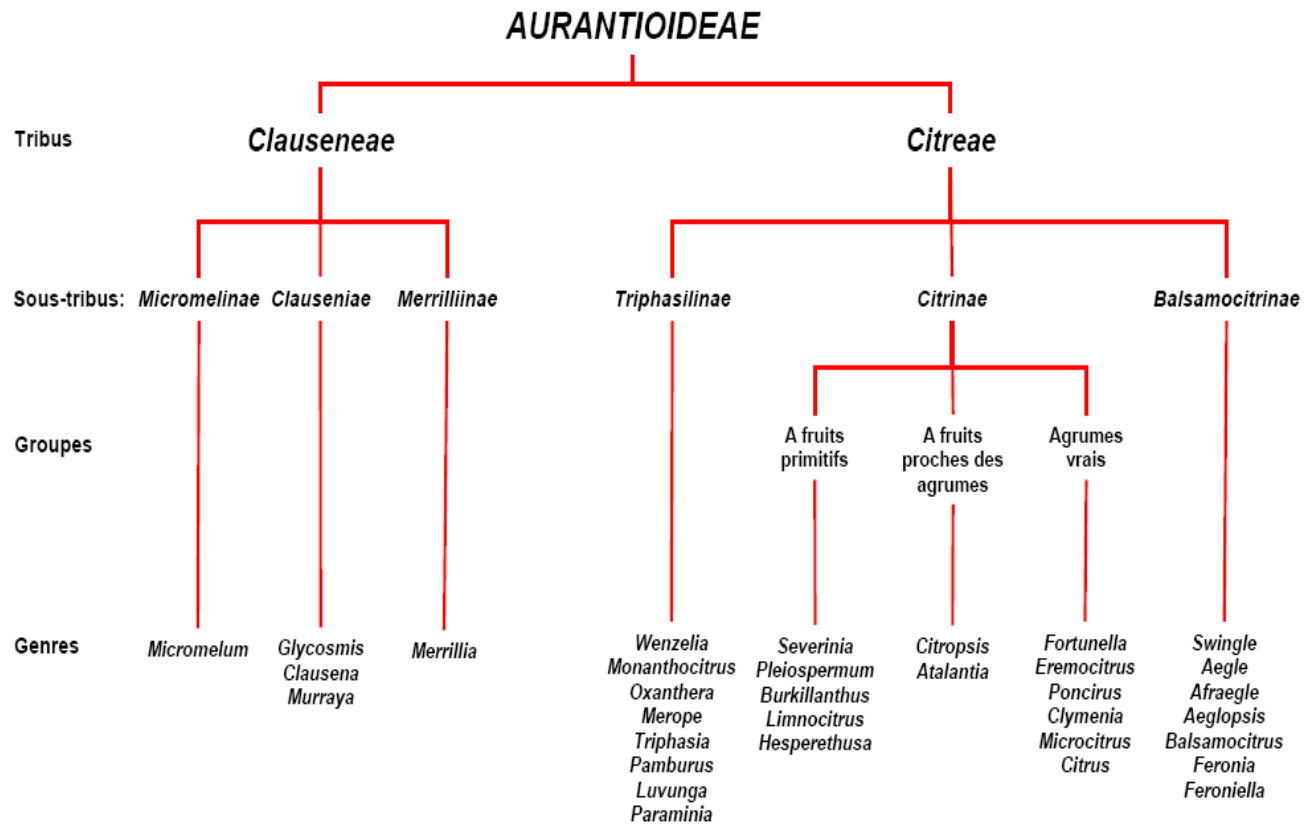


Figure 2: Taxonomie des *Aurantioideae*, d'après Swingle et Reece (1967)

La taxonomie des *Citrus* reste assez confuse et controversée, probablement en raison d'une diversité agromorphologique considérable, d'une fréquence élevée de mutations, d'une large compatibilité sexuelle, d'apomixie facultative, d'un long passé de culture et de dispersion (Nicolosi, et al. 2000). Tous les travaux de classification des agrumes réalisés dans le passé sont basés sur des différences anatomiques, morphologiques et géographiques. Parmi les nombreuses classifications proposées, celles de Swingle et Reece (1967) et Tanaka (1961) sont les plus utilisées. Ainsi, Swingle et Reece (1967) considèrent que le genre *Citrus* est composé de deux sous-genres : *Citrus* et *Papeda*. Les deux sous-genres sont distingués sur des critères morphologiques et sur la composition chimique des fleurs, des feuilles et des fruits. Cependant, Tanaka (1977) considère le genre *Citrus* composé de deux sous-genres, *Archicitrus* et *Metacitrus*, eux-mêmes divisés en huit sections, quinze sous-sections, neuf groupes, deux sous-groupes, deux microgroupes et 162 espèces.

A partir de données phénotypiques, Scora (1975) et Barrett et Rhodes (1976) suggèrent qu'il y a seulement trois taxons de base chez les agrumes, les cédratiers (*C. medica* L.), les

mandariniers (*C. reticulata* Blanco) et les pamplemoussiers (*C. maxima* (Burm.) Merr.). Ces auteurs sont les premiers à suggérer que les autres espèces sont issues d'hybridations entre ces espèces « vraies ». Ces dernières années, le développement de marqueurs biochimiques et moléculaires a permis de mener des études de diversité et de phylogénie. Les études réalisées avec des marqueurs isoenzymes (Herrero, *et al.* 1996; Torres, *et al.* 1978), RFLP (Federici, *et al.* 1998), RAPD (Corazza-Nunes, *et al.* 2002; Nicolosi 2007; Nicolosi, *et al.* 2000), ISSR (Fang, *et al.* 1998; Gulsen et Roose 2001), SSR (Barkley, *et al.* 2006; Corazza-Nunes, *et al.* 2002; Luro, *et al.* 2000), confirment les résultats de Barrett et Rhodes (1976). Cependant, Federici *et al.* (1998) suggèrent l'existence d'un quatrième taxon de base appartenant aux papédas. Ce résultat a été confirmé par diverses études utilisant des marqueurs de l'ADN cytoplasmique (Froelicher, *et al.* 2010; Nicolosi, *et al.* 2000). *C. micrantha* pourrait être le représentant de ce groupe des *Papeda* en tant qu'espèce la plus primitive (Hodgson 1967; Nicolosi, *et al.* 2000).

Ainsi, l'hypothèse actuelle tend en faveur de quatre taxons à l'origine de l'ensemble des espèces cultivées : cédratier (*Citrus medica*), mandarinier (*Citrus reticulata*), pamplemoussier (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) et micrantha (*Citrus micrantha* Wester). L'ensemble des espèces cultivées résulterait d'hybridations entre ces taxons de base mis en contact à la faveur des échanges commerciaux et des grandes invasions. En fait, les orangers (*C. sinensis*) les pomelos (*C. paradisi*), les citronniers (*C. limon*), les limettiers (*C. aurantifolia*), et les bigaradiers (*C. aurantium*) seraient issus de croisements directs ou de backcross, fixés par l'apomixie et élevés au rang d'espèces par certains taxonomistes. La diversification secondaire de ces « espèces » aurait alors essentiellement été assurée par mutation. Les bigaradiers et les orangers seraient respectivement issus d'une hybridation et d'un backcross entre pamplemoussier et mandarinier. Le pomelo serait l'hybride entre oranger et pamplemoussier. Les organites cytoplasmiques des bigaradiers, des orangers, des pomelos proviendraient du pool des pamplemoussiers (Froelicher, *et al.* 2010; Nicolosi, *et al.* 2000). L'origine des citronniers et des limettiers est plus complexe. Leur taxonomie est encore controversée et même les noms communs "lime" et "citron" n'ont pas de correspondance avec la taxonomie des Citrus. L'utilisation de marqueurs moléculaires a permis d'établir qu'ils sont le résultat d'une diversification secondaire (Barkley, *et al.* 2006; Nicolosi, *et al.* 2000; Scora 1975). Les limettiers et les citronniers possèdent comme caractéristiques communes des allèles de cédratiers ainsi que des caractères phénotypiques tels que l'acidité et la couleur jaune tendant à montrer leur apparentement avec ces derniers. De plus, les citronniers possèdent des allèles de mandariniers et de pamplemoussiers. La synthèse des données

chloroplastiques et nucléaires indique que les mandariniers et pamplemoussiers ont également contribué à l'apparition des citronniers. Chez les limettiers, deux catégories sont décrites, ceux à gros fruits et ceux à petits fruits (Hodgson 1967). Le limettier à petits fruits, *C. aurantifolia* type "Mexicain", possède un génome cytoplasmique de *micrantha*. Les travaux réalisés par Nicolosi *et al.* (2000) avec des marqueurs chloroplastiques et confirmés par Froelicher *et al.* (2010) avec des marqueurs mitochondriaux suggèrent ainsi que le limettier "Mexicain" (*C. aurantifolia*) serait issu d'une hybridation entre le cédratier et *C. micrantha*. Les limettiers à gros fruits *C. aurantifolia* selon la classification de Swingle et Reece (1967), *C. latifolia* selon la classification de Tanaka (1961) de type "Tahiti" ou "Bears", mais également les limes douces *C. limettioides* "Palestine", "Brazilian" et les limettes type "Marrakech" possèdent tous un cytoplasme ayant pour origine les pamplemoussiers (Froelicher, *et al.* 2010; Nicolosi, *et al.* 2000). Pour Nicolosi *et al.* (2000), les limes douces seraient le résultat de croisement entre bigaradier et cédratier tandis que pour Bayer *et al.* (2009) la lime "Tahiti" serait le produit d'un croisement entre citronnier (*C. limon*) et limettier "Mexicain" (*C. aurantifolia*).

I.1.3 Contexte économique

I.1.3.1 Au niveau mondial

Du point de vue économique, les agrumes représentent la première production fruitière mondiale, avec 124 millions de tonnes en 2009 (FAOSTAT 2010) devant la banane (90 millions de tonnes) et largement devant la pomme et le raisin (respectivement 64 et 66 millions de tonnes). La production totale des agrumes est en constante augmentation. La moitié de la production mondiale est destinée à l'autoconsommation.

Les principaux pays producteurs sont la Chine (22 MT), le Brésil (20,7 MT), les Etats-Unis d'Amérique (11,7 MT), le Mexique (7,5 MT), l'Inde (7,2 MT) et l'Espagne (5,9 MT) (FAOSTAT 2010). La Floride et la région de Sao Paolo sont les deux plus importantes régions de production d'agrumes au monde, production essentiellement constituée d'oranges.

Le groupe des agrumes est très hétérogène, une large gamme de produits le compose. Les oranges forment le premier groupe variétal avec 55% des volumes. Les petits agrumes de type clémentines et mandarines comptent pour environ 23% des volumes produits. Leur culture est plus récente que les oranges mais plus dynamique. Les citrons/limes et les pomélos arrivent respectivement en troisième (11% de la production mondiale) et quatrième position (4%). Les

agrumes que l'on peut qualifier de marginaux (cédrat, kumquat, etc.) ne représentent qu'une infime partie de l'offre mondiale.

Environ 65% de la production mondiale est destinée au marché du fruit frais, le reste alimente l'industrie agroalimentaire, notamment pour la transformation en jus. Par ailleurs, dans le bassin méditerranéen et en Chine, la majorité de la production est assignée au marché du fruit frais, à l'inverse du Brésil et de la Floride où la plus grande part de la production est vouée à la transformation (Figure 3).

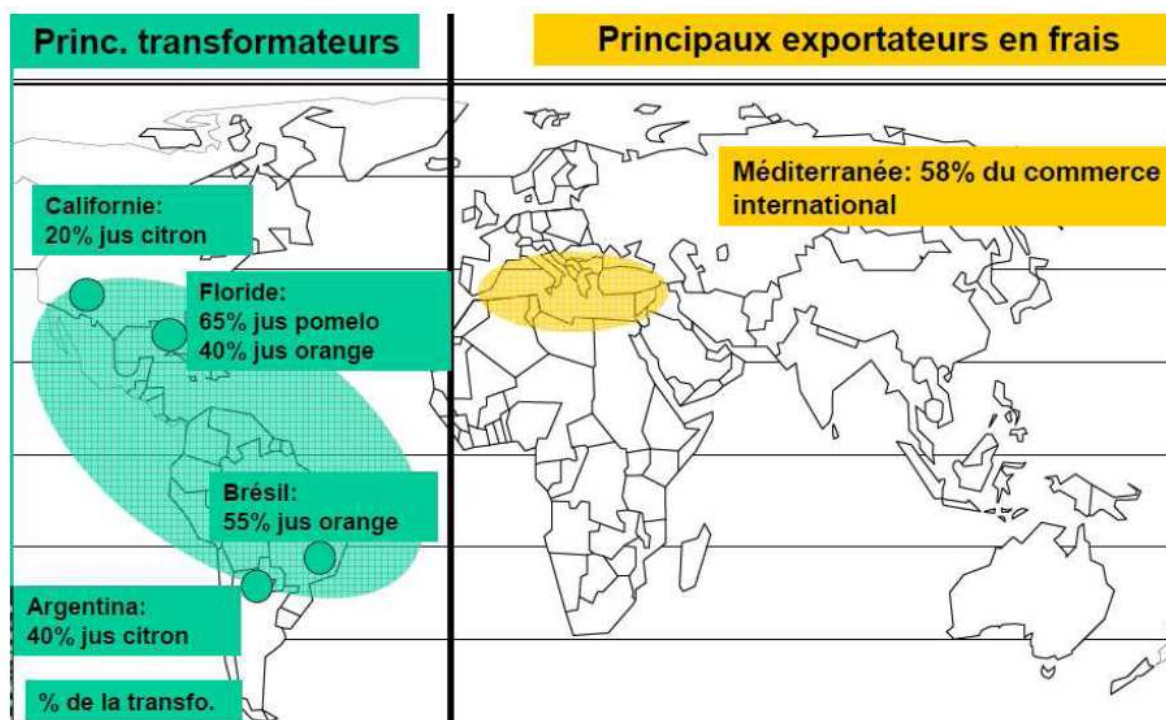


Figure 3: Principales régions productrices d'agrumes pour le marché du fruit frais et la transformation, (Imbert 2008)

I.1.3.2 Au niveau du bassin méditerranéen

La Méditerranée fait partie des principales zones de production agrumicoles dans le monde. Elle figure en troisième position, avec 17 millions de tonnes, derrière la Chine et le Brésil. Le taux de croissance des exportations du bassin méditerranéen a augmenté significativement ces dernières années d'environ 2,5% par an au lieu de 1,2% entre 1975 et 1995 (Imbert 2007). Le bassin méditerranéen a su tirer profit de ses nombreux atouts pour développer une stratégie visant à s'imposer sur le marché mondial des agrumes frais. Les clés de ce succès sont un climat favorable à la production de fruits de première qualité, une gamme variétale en constante évolution, la mise en place d'importantes règles de protection phytosanitaires et enfin la recherche et le développement de nouveaux marchés (Europe de l'Est, Chine, Moyen-

Orient). Ainsi, un agrume frais sur deux échangés dans le monde provient de cette région (Imbert 2005). La transformation reste pour les producteurs de cette zone un outil de régulation du marché en permettant d'absorber et de valoriser les écarts de triage (Imbert 2008).

Le profil variétal est largement dominé par les oranges (50%) suivies des « petits » fruits avec près de 20% (Imbert 2005). Deux types de pays producteurs peuvent être distingués. Des pays producteurs-consommateurs tels que l'Italie, l'Egypte, la Turquie ou la Grèce qui représentent dans l'ensemble 40% de la production méditerranéenne mais plus de 70% de la consommation régionale. Enfin, des pays producteurs-exportateurs, notamment l'Espagne, le Maroc et Israël qui représentent 50% de la production méditerranéenne et près de 75% des exportations.

I.1.3.3 Au Maroc

La filière agrume, premier groupe de fruits exportés, considérée comme un secteur stratégique participant à l'équilibre de la balance commerciale, a été hissée au premier rang des priorités de la politique agricole (Figure 4). En effet, la mise en place du plan « Maroc vert » montre la volonté des décideurs politiques marocains de remettre l'agriculture au centre du développement économique du pays durant la prochaine décennie. En plus de l'agriculture traditionnelle, ce plan concerne les cultures d'exportation afin de renforcer la compétitivité au niveau international en exploitant les avantages comparatifs du pays en terme de coût de main d'œuvre, de savoir faire et de proximité du marché européen.

L'objectif assigné au secteur agrumicole est de faire passer la production d'environ 1,3 million de tonnes à 3,8 millions de tonnes d'ici la fin de la décennie. Afin d'y parvenir, il est prévu d'augmenter la productivité actuellement située entre 15 et 26 t/ha et de s'attaquer au problème de vieillissement des vergers (Ministère de l'agriculture Marocain. 2009).

Ce plan tient compte des faiblesses du Maroc en ressources hydriques (80% du territoire situé en zone semi-aride) mais aussi de la position fragilisée du Maroc sur le marché européen. En effet, après une expansion rapide des exportations dans les années 70, le Maroc est confronté depuis les années 80 à des difficultés pour maintenir ses parts de marché face à un rétrécissement des marchés d'exportation traditionnels. L'adhésion de l'Espagne à la CEE en 1986 et une internationalisation accrue des échanges ont modifié les règles du jeu dans le sens d'une concurrence plus intense qui oblige le Maroc à redéfinir sa position concurrentielle. Cette concurrence de l'Espagne au niveau du marché européen, une recherche de nouveaux

marchés est un point essentiel au développement de la filière au Maroc. En effet, la production marocaine s'oriente principalement vers les marchés Canadien et Russe en attendant l'ouverture du marché Chinois (Ministère de l'agriculture Marocain. 2009).

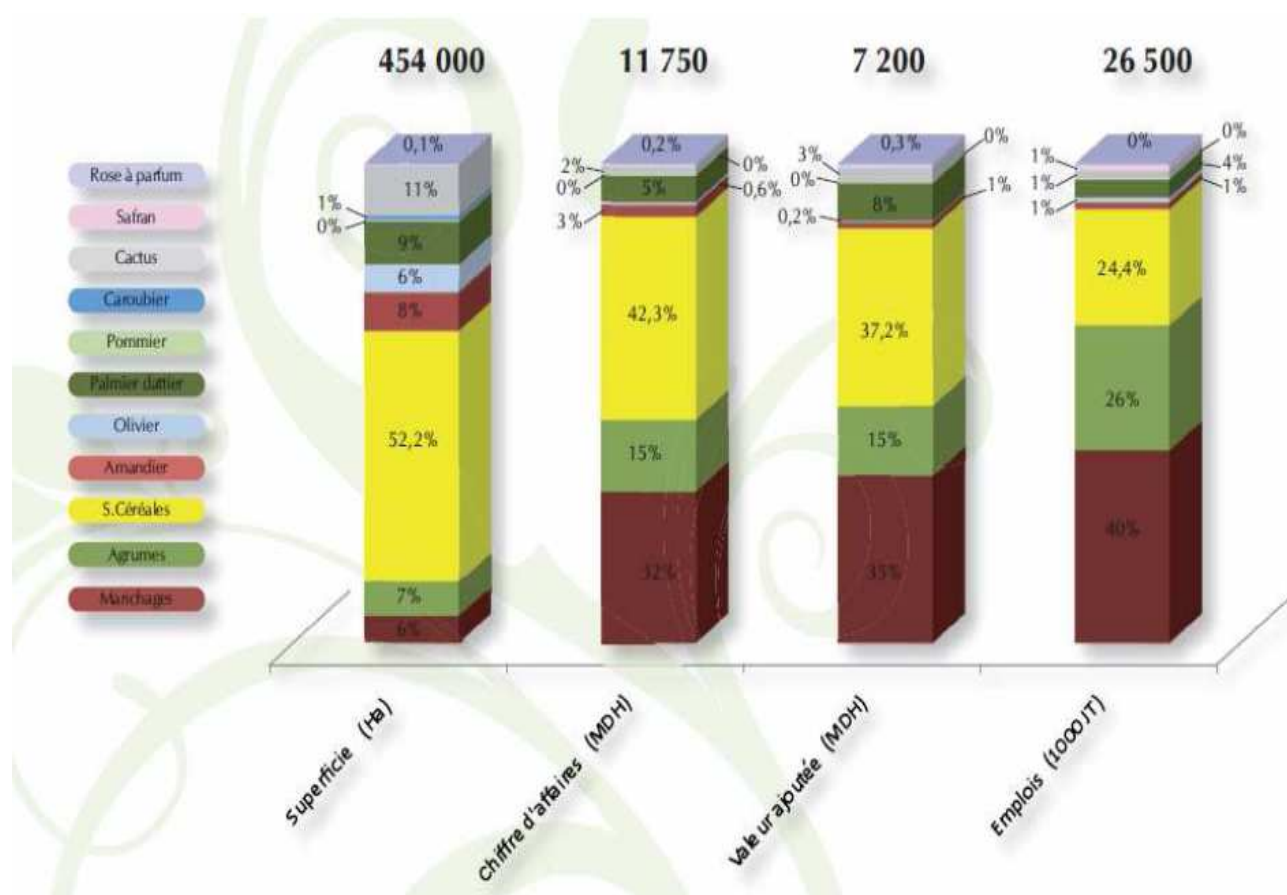


Figure 4: Occupation de l'espace agricole et performances des filières de production au Maroc, plan Maroc Vert 2009

Suite à la stagnation de la consommation d'oranges qui sont devenues des produits banalisés et souffrent d'une érosion sur les marchés européens provoquant ainsi un recul des ventes, le Maroc a amorcé une redistribution de ses parts de marché en s'orientant vers la production de petits fruits qui représentent un potentiel de croissance important.

I.1.4 Contraintes environnementales

L'agrumiculture fait face à de nombreuses contraintes biotiques et abiotiques qui représentent de sérieuses menaces pour la production. Ainsi, la campagne 2004-2005 a connu une baisse de la production dans certaines grandes zones agrumicoles comme le Brésil, les Etats-Unis et l'Espagne due aux mauvaises conditions météorologiques. La raréfaction des ressources en

eau et la dégradation de sa qualité (salinité, métaux lourds) sont également des contraintes abiotiques majeures pour de nombreux pays du Sud. Deux bactérioses, le chancre citrique (*Xanthomonas campestris*) (Hartung, *et al.* 1993) et le 'Huanglongbing' (*Liberobacter asiaticum*) (Tian, *et al.* 1996), sont responsables de la baisse de la production des deux régions de production majeures : le Brésil et les Etats-Unis. La cercosporiose, maladie fongique due à *Phaemularia angolensis*, sévit en Afrique et se répand très rapidement. La faible diversité génétique chez les orangers est responsable de la fragilité des productions face aux maladies émergentes et invasives.

I.1.5 Attentes du marché

L'agrumiculture doit prendre en compte les attentes des consommateurs et du marché mondial, de plus en plus exigeants en terme de qualité. Des politiques de segmentation du marché sont mises en place dans le secteur des petits agrumes. Pour le marché du fruit frais, l'absence de pépins et la coloration des fruits sont des critères de qualité essentiels. En effet, les grands exportateurs de variétés de clémentines sans pépins, comme l'Espagne et le Maroc, ont connu un succès important en Europe et aux Etats-Unis. La production américaine de ces variétés appartenant au groupe des mandarines a augmenté de manière spectaculaire au cours de la dernière décennie. Cette évolution repose sur des critères de qualité tels que la facilité d'épluchage, le calibre et l'absence de pépins. Cette expansion du marché des agrumes conduit les pays producteurs à s'impliquer dans des projets de création variétale. Plusieurs objectifs sont visés: élargir la gamme des produits sur des critères de qualité, répondre aux contraintes croissantes imposées par les stress biotiques et abiotiques et l'extension de la période de production. Les Etats-Unis, Israël et le Japon ont été les pays les plus actifs dans le domaine de l'amélioration variétale dans les années 70 et 80. Aujourd'hui, l'Italie, les Etats-Unis, l'Espagne, l'Australie et le Maroc proposent de nouvelles variétés protégées.

I.1.6 Objectifs d'amélioration des agrumes

I.1.6.1 Généralités

De nombreuses variétés cultivées à travers le monde sont issues de sélections d'hybrides spontanés ou de sélections de mutations spontanées identifiées dans les vergers. Depuis la fin du XIX^e siècle, les programmes d'amélioration ont exploité la facilité des agrumes à s'hybrider entre eux pour améliorer les caractères pomologiques ou agronomiques des variétés dites défailtantes. En effet, la compatibilité sexuelle s'est avérée très large, tant pour

les combinaisons intra et interspécifiques qu'intergénériques. De plus, de longs cycles de recherche ou d'induction de variabilité (prospection de mutants, hybridation, mutagenèse, biotechnologies...), suivis de processus de sélection et validation, ont été entrepris par différentes équipes à travers le monde chez les agrumes. Le perfectionnement des techniques horticoles a permis de contourner les diverses contraintes environnementales (salinité, pression parasitaire...) par l'utilisation de l'association cultivar / porte-greffe (Aubert et Vullin 1997). Ceci permet de distinguer des objectifs liés à l'amélioration des porte-greffe et d'autres liés à l'amélioration variétale, en tenant compte des besoins spécifiques de chaque région du monde.

I.1.6.2 Amélioration des porte-greffe

La sélection de porte-greffe à multiplication végétative est une nécessité agronomique pour garantir la production et assurer son développement dans différentes régions du monde présentant des conditions agro-environnementales contrastées. Le travail de création et de sélection a pour but de trouver des porte-greffe adaptés aux caractéristiques des sols et aux différents pathogènes qui s'y trouvent. Dans le bassin méditerranéen, les principaux problèmes rencontrés sont la salinité, l'alcalinité des sols calcaires, le virus de la *Tristeza*, les nématodes et le *Phytophthora*. Jusqu'à l'arrivée de la *Tristeza*, le principal porte-greffe utilisé était le bigaradier car il était l'un des rares à tolérer, dans une certaine mesure, la salinité, les pH élevés, et les sols calcaires (Grosser, *et al.* 2004). Toutefois, les arbres greffés sur bigaradier sont plus vulnérables aux maladies causées par certaines souches du virus de la *Tristeza* des agrumes (Rao, *et al.* 2008). De nouveaux porte-greffe offrant une bonne compatibilité avec les cultivars d'agrumes locaux et tolérants à ces diverses contraintes doivent être trouvés. D'intéressants caractères de tolérance vis-à-vis de stress biotiques et abiotiques existent dans les espèces du genre *Citrus* et des genres apparentés. La recombinaison génétique, utilisable pour exploiter cette diversité génétique, est limitée par la biologie de la reproduction des agrumes et la forte hétérozygotie de la plupart des cultivars et porte-greffe. En revanche, l'hybridation somatique apparaît comme étant une voie plus favorable au cumul des caractères d'intérêt agronomique et de tolérances à des pathogènes tels que la *Tristeza* et le *Phytophthora*.

Le porte-greffe doit être également compatible au greffage avec la variété et favoriser le développement durable d'arbres capables de produire des fruits en grandes quantités et de bonne qualité (Khan et Kender 2007). Les porte-greffe permettent de moduler le comportement de l'association porte-greffe/cultivar pour de nombreux caractères. Ainsi pour

l'ensemble des zones de culture, la sélection d'un porte-greffe conférant à l'association porte-greffe/cultivar une résistance ou une tolérance à la *Tristeza* est une priorité. La majorité des pays producteurs s'orientent vers la reconversion de leur verger en utilisant des porte-greffe tolérants ou résistants à cette maladie. Cependant, il apparaît que la plupart des porte-greffe tolérants sont mal adaptés à plusieurs autres contraintes. L'objectif majeur est de créer de nouveaux porte-greffe cumulant des tolérances aux contraintes biotiques et abiotiques tout en conférant un niveau de qualité élevée aux fruits.

I.1.6.3 Amélioration variétale

Les qualités visuelles et organoleptiques des fruits restent des critères très importants pour le marché du fruit frais. La composante organoleptique de la qualité est très importante mais subjective et variable en fonction des régions géographiques de consommation. Ainsi, des différences notables d'appréciation existent entre les différents pays de l'Union Européenne. Pour répondre à la diversité des goûts, des sélectionneurs développent une gamme variétale de qualité variable s'adaptant à la demande. Cependant, d'autres contraintes, telles que l'étalement de la production, la longueur de la phase juvénile, le calibre, la productivité, la conservation ou l'absence de critères de sélection précoce pour la plupart des caractères sont autant de problématiques auxquelles les programmes de sélection s'intéressent.

Un des critères majeurs du marché du fruit frais et du jus est l'aspermie. En effet, le consommateur veut des fruits sans pépins et la présence de graines pourrait être associée à la présence de composés aromatiques défavorables et à l'amertume dans les jus (Ollitrault, *et al.* 2008).

I.1.6.4 Enjeux et perspectives de l'amélioration dans le bassin méditerranéen

L'agrumiculture méditerranéenne est soumise à de fortes contraintes biotiques et abiotiques et répondant à un marché du fruit frais très exigeant en termes de qualité, positionne clairement la sélection variétale comme un enjeu central du développement agrumicole dans la région.

Le développement de programmes de création et de sélection variétales est devenu une nécessité de premier ordre pour le pays producteurs d'autant que se généralise la politique de protection variétale. Ces programmes d'amélioration concernent deux axes principaux. Premièrement, la création de porte-greffe adaptés aux différents types de sols, aux pathogènes qui s'y trouvent et le choix d'une bonne association porte-greffe/cultivar pour de nombreux caractères comme la résistance à la *Tristeza*, au froid, la vigueur et la productivité. Le

deuxième axe concerne la création de nouvelles variétés afin d'établir et de développer une gamme variétale susceptible de répondre à la diversité de la demande du marché et permettre l'étalement de la production par le biais de variétés tardives. Plusieurs pays du nord de la méditerranée se basent sur la multiplication végétative et s'appuient de plus en plus sur les avancées des biotechnologies.

I.1.6.5 Enjeux et perspectives de l'amélioration au Maroc

Le Maroc possède une longue tradition d'amélioration conventionnelle. Certaines variétés très intéressantes telles que le mandarinier « Afourer » ou le clémentinier « Guerdane » ont été sélectionnées respectivement à l'Inra du Maroc et chez un groupe privé « Les Domaines Abbes Kabbage ». De plus, l'arrivée de la *Tristeza* dans les années 80 a totalement remis en cause l'utilisation du bigaradier (*C. aurantium*), porte-greffe quasi exclusif dans les vergers marocains. Le Maroc s'est ainsi engagé dans la reconversion de ces vergers à l'aide de porte-greffe tolérants à cette maladie. Plusieurs tests de nouveaux porte-greffe, tels que le citrange Carrizo, et les *Poncirus* Rubidoux et Pomeroy, basés sur des recherches entreprises en Corse et en Espagne sont conduits par l'Inra Maroc.

Afin d'optimiser l'innovation variétale chez les agrumes, le Maroc s'est engagé récemment sur la voie de l'amélioration à l'aide des biotechnologies.

L'objectif de certains instituts et d'entreprises privés est d'obtenir rapidement de nouvelles variétés d'excellentes qualités et sans pépins afin de segmenter le marché et répondre à la demande de pays très exigeants en terme de qualité.

De plus la présence du psylle *Toxoptera aurantii*, vecteur de la tristeza fait craindre une épidémie. L'Inra du Maroc au côté du Cirad s'est récemment engagé dans un programme d'hybridation somatique pour tenter de créer un porte-greffe cumulant les caractères de tolérance aux contraintes biotiques et abiotiques.

I.2 CONTEXTE BIOLOGIQUE DE L'AMELIORATION VARIETALE DES AGRUMES

I.2.1 Diversité phénotypique chez les agrumes

La diversité agromorphologique des agrumes est considérable (Figure 5). Elle concerne aussi bien les caractères organoleptiques et pomologiques que les résistances aux facteurs biotiques

ou abiotiques. Ainsi, cette diversité ouvre des perspectives intéressantes pour l'utilisation des ressources génétiques en amélioration variétale. Elle est fortement marquée entre les espèces.



Figure 5: Diversité pomologique des fruits d'agrumes : A = les cédrats ; B = les pomelos ; C = les oranges ; D = les limes ; E = les mandarines et F = les citrons.

Cette variabilité se manifeste particulièrement au niveau des fruits. Le diamètre des fruits peut varier de quelques millimètres chez certains kumquats et micrantha à plus de 30 centimètres pour certains pamplemoussiers. L'épaisseur de l'albedo quasi inexistant chez les mandariniers constitue la majeure partie du fruit chez les cédratiers. La coloration du fruit, due à la présence de métabolites secondaires, les flavonoïdes (anthocyanes) et/ou les caroténoïdes (lycopène, bêta carotène, volaxanthine...) varie du jaune/vert chez les limettiers, les cédratiers, les citronniers, les pamplemoussiers au rouge/orange chez les orangers et mandariniers voire au violacé chez les *Microcitrus*. La pulpe peut également présenter des couleurs et des teneurs en acidité variables entre les espèces. Les agrumes présentent un port variable en fonction des espèces allant du buisson à l'arbre. Au niveau foliaire, les feuilles des *Citrus* sont majoritairement monofoliées, persistantes et présentent des tailles et formes

variables suivant les espèces. Seuls les *Poncirus* se caractérisent par des feuilles totalement trifoliées et caduques.

I.2.2 Ploïdie et cytogénétique des agrumes

Les agrumes et les genres apparentés, à grande majorité diploïdes, ont un nombre de chromosomes de base n égal à 9, soit $2n = 2x = 18$ (Krug 1943). Des phénomènes de polyploïdisation naturelle peuvent survenir, mais seuls quelques polyploïdes naturels ont été identifiés, tels que *Fortunella hindsii* (Praloran 1971), tétraploïde ; *Citrus latifolia* (Nogler 1984), triploïde ; *Clausena excavata*, allotétraploïde (Froelicher, *et al.* 2000) et *Glycosmis pentaphylla*, hexaploïde (Richards 1986).

Le comportement méiotique des agrumes ainsi que leurs hybrides interspécifiques et inter génériques est généralement régulier, et les irrégularités méiotiques sont peu fréquentes (Cavalcante, *et al.* 2000).

I.2.3 Système de reproduction chez les agrumes

I.2.3.1 Généralités

Les agrumes sont caractérisés par une floraison abondante. Pour la majorité des espèces, elle a lieu en début de printemps dans l'hémisphère nord, néanmoins certaines variétés telles que le citronnier Eureka, sont capables de fleurir plusieurs fois par an. La période de floraison pour une même variété peut varier d'une zone géographique à une autre et selon les températures au moment de l'induction florale en fin d'hiver. En revanche, les *Poncirus* fleurissent plus précocement (un mois plus tôt) et le développement des bourgeons floraux précède celui des bourgeons végétatifs. Les agrumes du genre *Fortunella* possèdent la floraison la plus tardive, soit environ deux mois après la floraison des *Citrus*. Ces écarts de précocité de floraison contribuent à l'accroissement de la différenciation génétique entre ces trois genres.

La fleur est de type hermaphrodite, formée de 3 à 5 sépales qui constituent le calice, de 4 à 8 pétales blancs ou légèrement pourpres qui constituent la corolle et enfin des appareils reproducteurs mâles (étamines) et femelles (pistil et stigmate). Chez certaines espèces comme *Poncirus trifoliata*, *Citrus limon*, *C. aurantifolia* et *C. medica*, le pistil peut être absent ou atrophié chez un bon nombre de fleurs. La proportion de fleurs portant des anthères vides est également variable suivant le cultivar et les conditions de culture.

Le stigmate est réceptif quelques jours avant l'anthèse et plusieurs jours après. Chez certains cultivars, l'autopollinisation est facilitée par la proximité entre l'anthère et le stigmate ou par la déhiscence précoce des anthères. Cependant, l'allopollinisation par le biais d'insectes est la stratégie la plus commune grâce au pouvoir attractif des fleurs (l'attrait de la corolle, le parfum, le nectar abondant, le pollen). On assiste à une chute de fleurs et de jeunes fruits tout juste noués souvent dans des proportions importantes (90% chez le citronnier, 95% chez l'oranger et le clémentinier).

La reproduction chez les agrumes peut se faire selon deux voies : sexuée et asexuée (Koltunow, *et al.* 1995a). Le système de reproduction des agrumes se caractérise par une grande diversité de comportement. La polyembryonie et l'apomixie de nombreux génotypes constituent sans doute sa plus grande originalité et ont sans doute limité considérablement les brassages génétiques en induisant, dans les semis, des fréquences très élevées de multiplication conforme du génotype maternel. A l'inverse, l'autoincompatibilité a dû favoriser la recombinaison dans les populations monoembryonnées.

I.2.3.2 Apomixie

I.2.3.2.1 *Dans le règne végétal*

La capacité des plantes à fleurs de concevoir un nouvel individu dans une graine n'est pas nécessairement liée à la sexualité. Certains angiospermes se reproduisent de manière asexuée via les semences par un processus appelé apomixie (García, *et al.* 1999). L'existence de l'apomixie est un argument qui va à l'encontre de l'absolue nécessité de la sexualité. L'apomixie donne naissance à des graines fertiles dont les embryons découlent directement des cellules maternelles plutôt que d'une fécondation entre gamètes mâles et femelles. Par conséquent, ces embryons ont une constitution génétique identique à celle du parent femelle. Cette caractéristique est observée dans plus de 300 espèces végétales appartenant à 35 familles (Kepiro et Roose 2007). Les plus représentées sont les *Gramineae*, les *Compositae*, les *Rosaceae* et les *Rutaceae* (Cameron et Garber 1968).

La reproduction apomictique est généralement attribuable à deux mécanismes (Figure 6): l'apomixie sporophytique (embryonie adventive) et l'apomixie gamétophytique (Esen et Soost 1977; Koltunow, *et al.* 1995b).

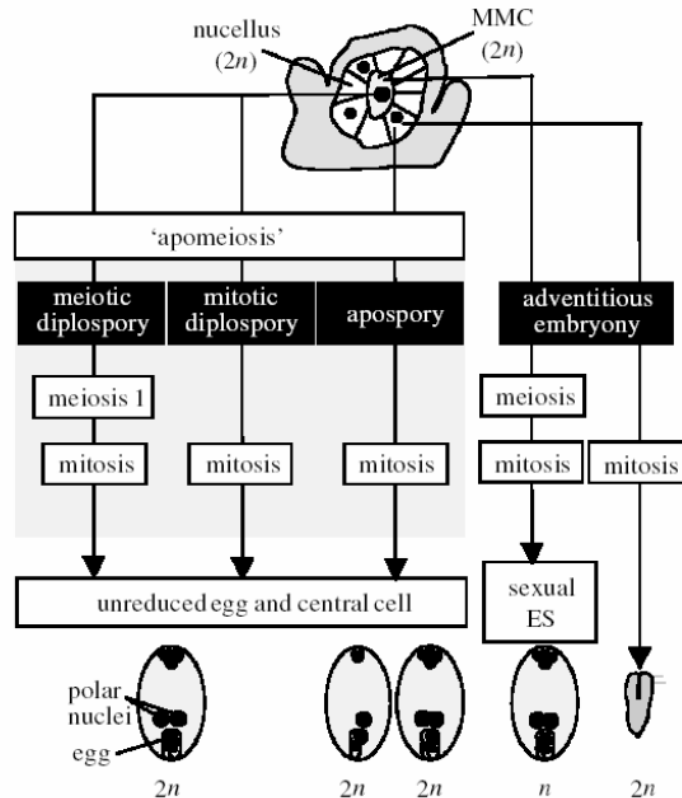


Figure 6: Principales voies de l'apomixie, Spielman *et al.* (2003)

En cas d'apomixie sporophytique, les embryons se forment directement à partir des cellules nucellaires tandis qu'en cas d'apomixie gamétophytique, l'embryon est issu du gamétophyte femelle par aposporie (développement de gamétophytes 2n, sans méiose à partir de cellules végétatives ou non reproductives du sporophyte) ou par diplosporie (l'embryon se forme directement à partir des cellules mères du mégaspore).

Les embryons nucellaires sont génétiquement identiques au parent femelle car ils sont formés de manière asexuée par division mitotique des cellules du nucelle. Lorsqu'au sein d'un même pépin se forment un embryon zygotique en plus d'embryons nucellaires, on parle de polyembryonie. Ainsi, une variété dite « polyembryonnée » est communément considérée apomictique. Toutefois, l'apomixie n'est pas à confondre avec le jumelage sexué. En effet, des embryons jumeaux peuvent être observés dans un même pépin (Aleza, *et al.* 2009; Soost 1987). Les plants résultant de ces pépins polyembryonnés sont identiques mais sont issus d'un croisement sexué et donc génétiquement différents de leur parent femelle. Bien que ce phénomène de jumelage soit rare (Aleza, *et al.* 2009; Chaudhury, *et al.* 2001), la présence de plusieurs embryons au sein d'un même pépin ne peut, à elle seule, indiquer une apomixie.

Chez certaines plantes, les embryons présents dans un même pépin peuvent avoir différentes origines génétiques. En effet, des embryons d'origine zygotique et nucellaire peuvent coexister. On parle alors d'apomixie partielle ou facultative.

L'apomixie est un mode de reproduction qui permet de fixer le génotype d'une variété supérieure, y compris les cultivars hybrides. Ce caractère peut être particulièrement intéressant puisque l'agriculture moderne repose sur l'uniformité des semences et des fruits et légumes. Ainsi, les semences peuvent être produites pour de nombreuses générations, sans perte de vigueur ou de ségrégations génotypiques. Par conséquent, la plupart des travaux de recherches, à ce jour, a porté sur l'introggression du caractère de l'apomixie par sélection traditionnelle dans les cultures d'importance économique. Toutefois, il s'agit d'un processus lent. L'identification des gènes impliqués dans l'initiation et le contrôle de l'apomixie serait un atout important pour pouvoir la transmettre par transformation génétique (Parlevliet et Cameron 1959).

1.2.3.2.2 Chez les agrumes

L'apomixie est un caractère très répandu chez les agrumes et certains genres proches appartenant aux *Rutaceae*. L'apomixie est de type sporophytique, elle est adventive nucellaire et partielle (Roose et Kupper 1992), c'est à dire que l'embryon zygotique et les embryons nucellaires se développent concomitamment (Khan et Roose 1988). Ainsi, lors du développement de l'embryon zygotique, certaines cellules du nucelle ne dégénèrent pas comme c'est le cas chez les espèces monoembryonnées et évoluent en embryogenèse, aboutissant à la formation d'un ou plusieurs embryons adventifs. La présence d'embryons nucellaires développés dans un pépin, peut perturber le développement de l'embryon zygotique. Au sein de ces pépins avec des embryons nucellaires, des embryons nucellaires et zygotique non développés sont présents mais ne germent pas à cause d'une compétition avec les embryons développés (Ollitrault et Luro 1997). L'embryon zygotique peut même avoir totalement disparu lorsque la graine est arrivée à maturité. La nécessité de la fécondation du sac embryonnaire sexué pour initier le développement des embryons nucellaires apomictiques demeure obscure. Soost et Cameron (1979) suggèrent qu'elle est nécessaire tandis que Chaudhury et al.(2001) affirment le contraire. Parmi les espèces de base du genre *Citrus*, *C. reticulata* et *C. micrantha* sont polyembryonnés alors que *C. medica* et *C. maxima* sont strictement monoembryonnés. La polyembryonie est également très largement présente chez les espèces secondaires représentant les grandes cultures d'aujourd'hui : orangers, pomelos, limettiers et citronniers. Les genres *Poncirus* (Figure 7), *Fortunella*, *Microcitrus* et

Eremocitrus ont une apomixie d'un degré relativement faible qui se traduit par un nombre moyen d'embryons par graine peu élevé, inférieur à deux (García, *et al.* 1999).



Figure 7: Graine polyembryonnée de *Poncirus trifoliata*

Ce type de reproduction a eu un impact significatif sur la diversité génétique des espèces et sur le maintien et la dispersion des structures génotypiques. Il a fixé certains génotypes hybrides et limité grandement le brassage par flux pollinique en conférant un avantage sélectif immédiat (à court terme) aux génotypes apomictiques existant. Au fil des générations, cette multiplication asexuée a probablement contribué à l'accumulation d'allèles défavorables provoqués par des mutations, maintenus à l'état hétérozygote récessif. Dans la littérature, la polyembryonie est décrite comme un caractère quantitatif dominant et vraisemblablement déterminé par un petit nombre de gènes dans le genre *Citrus* (Cameron et Frost 1968; Cameron et Soost 1979).

1.2.3.2.3 L'apomixie dans les programmes d'amélioration

1.2.3.2.3.1 Intérêts à l'amélioration de porte-greffe

La capacité de produire des embryons nucellaires générant des plantules identiques à l'arbre mère est un objectif essentiel dans les programmes d'amélioration de porte-greffe (Iwamasa, *et al.* 1967; Parlevliet et Cameron 1959). Elle permet une propagation génétiquement uniforme et ainsi, une réduction des variations de performance qui pourrait arriver en cas de reproduction sexuée de ces porte-greffe. Ainsi le travail de sélection réalisé sur les porte-greffe est basé sur la capacité de produire une descendance à fort taux d'embryons nucellaires et possédant les phénotypes recherchés.

L'ensemble des porte-greffe actuellement utilisés est polyembryonné. Ces porte-greffe produisent des graines qui contiennent des embryons, à la fois, nucellaires et zygotiques. La proportion d'embryons zygotiques qui se développent lors d'un semis varie en fonction du génotype et de l'environnement (Asíns, *et al.* 2002; García, *et al.* 1999). Le risque d'hétérogénéité génétique dans les semis est d'autant plus élevé que le degré de polyembryonie est faible. Une étude réalisée par Kepiro et Roose (2007) démontre que plus de 50% des plants régénérés à partir d'un semis de pépins de *Poncirus trifoliata* var. Flying Dragon sont zygotiques alors que le degré de polyembryonie (nombre moyen d'embryons par pépin) est voisin de 1,5.

1.2.3.2.3.2 Obstacles à l'amélioration variétale

Contrairement à l'amélioration des porte-greffe, l'apomixie partielle représente un obstacle pour l'amélioration variétale. Elle limite le choix des croisements réalisables car la majorité des cultivars à fort potentiel commercial est polyembryonnée. Effectivement, seules deux espèces (*C. medica* et *C. maxima*) ne présentent que des cultivars monoembryonnés. Pour les autres, le degré de polyembryonie peut varier de manière importante suivant les variétés (García, *et al.* 1999). Au sein des petits agrumes, seules quelques variétés sont monoembryonnées telles que le clémentinier, les mandariniers « Fortune » et « Wilking » et le tangor « Ellendale ». Ces variétés sont très utilisées dans les programmes d'innovations variétales.

1.2.3.2.4 Transmission de l'apomixie

Les travaux réalisés par Garcia *et al.* (1999) suggèrent que la polyembryonie est contrôlée par un seul gène dominant, hétérozygote chez les agrumes trifoliés et absent chez le pamplemoussier Chandler. De même, Kepiro et Roose (2009) identifient un unique QTL dominant hétérozygote chez *P. trifoliata* qui paraît essentiel à la production de plus de 2% de pépins polyembryonnés.

D'autres travaux suggèrent un contrôle multigénique de l'apomixie nucellaire et que la polyembryonie serait un caractère indépendant (Cameron et Soost 1980; Cameron et Soost 1979). En effet, Garcia *et al.* (1999) identifient deux QTLs chez *P. trifoliata* et quatre QTLs chez *C. volkameriana* impliqués dans le contrôle du caractère apomixie. Hong *et al.* (2001) ont proposé un modèle pour l'expression de l'apomixie, régi par deux gènes complémentaires A_1 et A_2 . Ils suggèrent que les génotypes A_1A_2 sont capables de produire des pépins via

l'apomixie. D'après eux, la combinaison $A_1 A_1$ est létale ce qui implique qu'un génotype apomictique est de type $A_1 a_1 A_2 _$. D'après ce modèle, le *Poncirus* possède le génotype $A_1 a_1 A_2 A_2$.

Par ailleurs, dans les semis de cultivars polyembryonnés, les proportions de plants zygotiques et nucellaires varient en fonction des conditions environnementales (Ollitrault 1990b). Plusieurs techniques ont été utilisées pour tenter d'accroître la proportion de plants zygotiques. Ainsi, un choix rigoureux des conditions environnementales (Ikeda 1981), des traitements chimiques (Tisserat et Murashige 1977), la culture *in vitro* d'embryons immatures (Juarez, *et al.* 1976) ou d'ovules (Tatum, *et al.* 1974) ainsi que des irradiations gamma (10 à 20 Gray) de boutons floraux un mois avant anthèse (Wenbaum, *et al.* 1982), permettent d'améliorer sensiblement l'obtention de plantes hybrides. De plus, des études *in vitro* ont permis d'identifier des substances, dont certains régulateurs de croissance, qui répriment l'embryogenèse nucellaire (Ollitrault 1990b).

1.2.3.2.5 Discrimination entre plants hybrides et nucellaires

Du point de vue morphologique, les plants nucellaires présentent, comme les plants zygotiques, des caractères de juvénilité marqués (présence d'épines, 1^{ère} induction florale tardive) et sont souvent plus vigoureux que les zygotes issus d'autofécondation. De nombreuses techniques biochimiques ont été expérimentées pour distinguer précocement les plants zygotiques et nucellaires : chromatographie en phase gazeuse (Soost 1965) ou chromatographie sur couche mince (Yamamoto, *et al.* 1995). L'électrophorèse d'isozymes s'est avérée performante pour les analyses de routine (Khan et Kender 2007). Aujourd'hui, l'utilisation de marqueurs moléculaires de type RFLP, RAPD, SSR ... permet de distinguer facilement les plants zygotiques, des nucellaires. Les marqueurs les plus performants sont les marqueurs co-dominants présentant du polymorphisme entre les parents. L'utilisation de cinq marqueurs co-dominants polymorphes permet d'atteindre une probabilité de 96,9% d'identification de zygotiques dans une situation d'autofécondation. La probabilité est évaluée par l'équation $[P=1-(0,5)^n]$ où n est le nombre de locus indépendants analysés (Luro 1993).

1.2.3.3 Aspermie chez les agrumes

L'aspermie est une caractéristique majeure pour le marché du fruit frais. De nombreux programmes d'amélioration sont développés afin de créer de nouveaux cultivars sans pépins.

Pour la production de fruits dépourvus de pépins, la parthénocarpie est nécessaire et elle doit être associée à de la stérilité ou de l'autoincompatibilité.

1.2.3.3.1 Aspermie au niveau diploïde

1.2.3.3.1.1 Stérilité mâle et femelle

Il existe différents niveaux de stérilité mâle chez les agrumes diploïdes (Iwamasa 1966). Les aberrations chromosomiques sont l'un des phénomènes les plus importants, menant à la stérilité pollinique. En effet, c'est la cause principale de la stérilité de l'orange Valencia, la stérilité pollinique partielle de la lime Mexicaine ou du pamplemoussier Marsh (Iwamasa 1966; Nesumi, *et al.* 2001; Raghuvanshi 1962). La stérilité mâle peut aussi être également induite par l'apparition d'étamines dégénérées comme chez les Satsuma (Koltunow, *et al.* 1998) et par la dégénérescence des cellules mères du pollen (PMC) comme chez l'orange Washington navel (Ton et Krezdorn 1967). Chez les Satsuma et leurs hybrides, la stérilité mâle serait due à une interaction nucléo-cytoplasmique et elle serait contrôlée par plus de deux gènes (Iwamasa 1966; Yamamoto, *et al.* 1997; Yamamoto, *et al.* 1992). Cette stérilité mâle cytoplasmique (CMS) se manifeste par une absence d'anthères, des anthères vides ou du pollen non viable. Elle est largement exploitée dans plusieurs programmes d'amélioration d'espèces cultivées (Linke, *et al.* 2003). La CMS est un caractère généralement hérité de la mère, déterminé par des gènes mitochondriaux ou par des interactions nucléo-cytoplasmiques. Elle affecte les organes reproducteurs mâles engendrant des dysfonctionnements tels que le développement anormal de certains organes floraux, l'absence d'étamines et la production de pollen non viable (Pelletier et Budar 2007). Ainsi, il a été observé une conversion des étamines en une structure carpellaire semblable à celle observée chez les mutants d'*Arabidopsis thaliana* : « *Apetala 3* » et « *Pistillata* » (Bowman, *et al.* 1989; Bowman, *et al.* 1991), et autres espèces (Leino, *et al.* 2003; Teixeira, *et al.* 2005).

Guo *et al.* (2004) et Cai *et al.* (2007) ont transféré par hybridation somatique le cytoplasme du mandarinier Satsuma dans des variétés fertiles afin de les rendre stériles. Cette stratégie est appliquée pour éliminer la production de pépins dans plusieurs cultivars d'agrumes diploïdes supérieurs.

Le degré de stérilité femelle est estimé sur la base du nombre de pépins par fruit issu de pollinisation manuelle (Iwamasa 1966; Raghuvanshi 1962). Ce résultat indique que la stérilité femelle est directement liée à l'aspermie.

Une forme de stérilité femelle héréditaire, ayant comme conséquence l'avortement du zygote, serait contrôlée par deux gènes (Soost 1965). Par ailleurs, comme pour la stérilité mâle, des altérations chromosomiques (délétion, translocation) pourraient causer une stérilité femelle telle que chez l'oranger Valencia et le pomelo Marsh.

Des outils de biotechnologies tels que la transformation, la mutagenèse induite par irradiation, ont permis de développer de nouveaux agrumes aspermes (Froneman, *et al.* 1996; Koltunow, *et al.* 1998).

Ainsi, l'irradiation de pépins et de bourgeons a permis la création de cultivars stériles aspermes tels que le pomelo « Star Ruby » et le mandarinier « Tango » (Roose et Williams 2005; Vardi, *et al.* 1993).

1.2.3.3.1.2 Autoincompatibilité

L'autoincompatibilité est un phénomène génétiquement contrôlé qui prévient la formation de pépins dans des plants fertiles autopollinisés. En effet, quand ils sont autopollinisés, les cultivars parthénocarpiques et autoincompatibles produisent des fruits sans pépins. Ton et Krezdorn (1967) n'ont observé aucun tube pollinique dans les ovaires de variétés autocompatibles en autofécondation. Chez les agrumes, seuls les pamplemoussiers ainsi que quelques mandariniers sont autoincompatibles (Hearn 1969). Ce caractère est très largement exploité par les agrumiculteurs qui cultivent en bloc monoclonaux ces variétés. Toutefois, la présence d'autres génotypes fertiles dans un environnement proche entraîne la production de pépins. Le représentant le plus connu de ces variétés autoincompatibles est le clémentinier. Toutefois, certains cultivars autoincompatibles en particulier chez des hybrides de mandariniers tels que « Minneola » et « Orlando » peuvent produire quelques pépins résiduels (Soost 1969). Ces cultivars faiblement parthénocarpiques ont besoin d'être croisés pour produire un bon rendement (Mustard, *et al.* 1956).

Le système d'incompatibilité chez les agrumes est de type gamétophytique (Soost 1965; Soost 1969). Wakana *et al.* (1998) suggèrent que les loci de l'incompatibilité et de la glutamate oxaloacetate transaminase seraient liés chez les agrumes. Ces recherches pourraient être utilisées pour la détection précoce de l'autoincompatibilité.

1.2.3.3.2 Cultivars triploïdes aspermes

La sélection de cultivars triploïdes est une méthode intéressante pour le développement de cultivars d'agrumes aspermes. En effet, la triploïdie est généralement associée à la stérilité

mâle et femelle. Un problème d'appariement entre chromosomes a lieu lors de la méiose. La synapse (appariement vrai) ne peut se produire qu'entre deux chromosomes homologues. Toutefois, un chromosome peut s'apparier sur une partie de sa longueur avec un chromosome et sur un autre sur le reste de sa longueur, ce qui donne naissance à un trivalent. Chez les triploïdes, la formation de trivalent mais également de bivalent plus un monovalent sont les possibilités d'appariements les plus fréquents. Si tous les chromosomes monovalents migrent vers le même pôle et parallèlement, les chromosomes bivalents migrent vers l'autre pôle, alors les gamètes formés seront respectivement haploïdes et diploïdes. La probabilité est cependant très faible. Toutes les autres possibilités aboutiront à la formation de gamètes aneuploïdes. Généralement, ce type de gamètes ne donne pas de descendance viables. Cette catégorie de gamètes est responsable de la quasi absence de fertilité des triploïdes. La triploïdie est également connue pour donner des fruits de calibre plus gros. La plus connue des variétés d'agrumes triploïdes est la lime de Tahiti. Ce triploïde naturel produit des fruits de taille importante sans pépins, alors que, la lime Mexicaine, diploïde, produit des fruits de petite taille à pépins. Différents programmes de création et sélection de triploïdes sont menés dans plusieurs pays et de nouveaux cultivars triploïdes ont été créés (Ollitrault, *et al.* 2008).

1.2.3.3 Mécanismes de formation naturelle des triploïdes et tétraploïdes spontanés chez les agrumes

Chez les agrumes, l'apparition spontanée de triploïdes dans des croisements entre diploïdes est relativement fréquente. La présence de triploïdes a été observée pour la première fois par Lapin (1937) sur des semis de mandariniers "Mikan". Ces triploïdes sont généralement issus des petits pépins présentant des embryons partiellement avortés obtenus chez un parent femelle monoembryonné (Ollitrault, *et al.* 1996) ou des pépins immatures en cas de polyembryonie (Stebbins 1958). Les études cytogénétiques réalisées ont mis en évidence une relation entre la triploïdie de l'embryon et la pentaploïdie de l'endosperme, démontrant ainsi que ces triploïdes spontanés étaient issus de gamètes femelles non réduits (Esen et Soost 1977). Ce ratio de ploïdie 5/3, entre l'endosperme et l'embryon zygotique, est généralement considéré comme étant à l'origine du mauvais développement ultérieur de l'embryon conduisant à des petits pépins. De rares formations de triploïdes suite à la fécondation d'un ovule haploïde par un pollen diploïde ont été observées (Luro, *et al.* 2004).

Deux mécanismes à l'origine des tétraploïdes d'agrumes sont identifiés :

Le premier mécanisme est le doublement du stock chromosomique des tissus du nucelle aboutissant à la formation de tétraploïdes dans des graines polyembryonnées (Cameron et Frost 1968). Ces tétraploïdes sont homogènes, proches du phénotype maternel et ne présentent aucun caractère du parent mâle (Ollitrault et Jacquemond 1994). La majorité des autotétraploïdes, utilisés dans les programmes de créations de triploïdes sont d'origine nucellaire, issus de cultivars polyembryonnés et sont aussi polyembryonnés (Ollitrault, *et al.* 2008).

Le second mécanisme est la formation de gamètes non réduits, appelés également $2n$ gamètes. Ces gamètes sont responsables de la formation de triploïdes spontanés dans les croisements $2x \times 2x$ (Ollitrault, *et al.* 1996). Ces triploïdes sont généralement issus des petits pépins ou pépins anormaux obtenus lors de ce genre de croisements (Esen et Soost 1971).

Grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires, il a été établi que la majorité des plants triploïdes issus dans les croisements de type $2x \times 2x$ sont formés suite à un phénomène de digynie, c'est-à-dire résultant de la fusion d'un ovule diploïde avec un pollen normal (haploïde) (Esen, *et al.* 1979; Luro, *et al.* 2004). De rares cas de triploïdie par diandrie ont été observés (Luro, *et al.* 2004).

Les ovules diploïdes sont formés suite à un déroulement anormal de la méiose entraînant une restitution en première division de méiose (appelée communément FDR (First Division Restitution)) ou une restitution en deuxième division de méiose (appelé communément SDR (Second Division Restitution)) (Figure 8). Chez le clémentinier et le mandarinier "Fortune", la restitution de l'hétérozygotie maternelle observée pour l'ensemble des loci est de type SDR (Cuenca, *et al.* soumis; Luro, *et al.* 2004). En revanche, chez l'oranger, la formation des ovules diploïdes a été décrite comme étant de type FDR (Chen, *et al.* 2008).

Cameron et Soost (1969) et Esen et Soost (1972) ont observé dans des croisements $2x \times 4x$ des triploïdes mais aussi des individus tétraploïdes. Ces derniers seraient issus de la fécondation d'un gamète femelle non réduit par un pollen de tétraploïde.

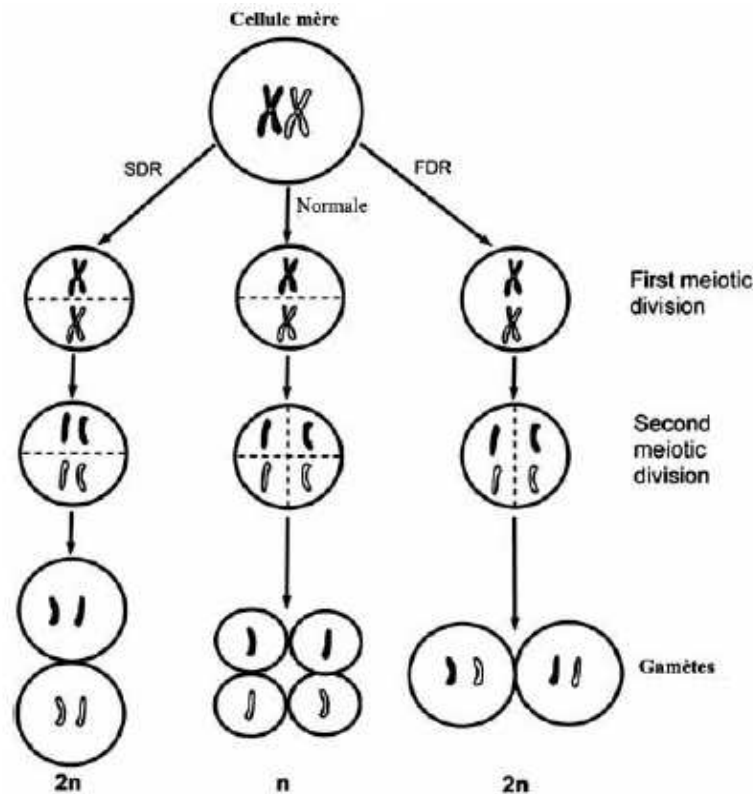


Figure 8: Schéma de déroulement de la FDR, la SDR et de la méiose normale dans une cellule mère, Cai et Xu (2007)

I.3 STRATEGIE D'AMELIORATION DES PETITS AGRUMES : LA VOIE TRIPLOÏDE

I.3.1 Intérêt des cultivars triploïdes

La création d'hybrides triploïdes est une autre voie permettant d'induire de la stérilité tout en créant de la variabilité phénotypique. En effet, le premier critère de qualité retenu est la recherche de l'aspermie des fruits. La voie choisie est la création de cultivars triploïdes en se basant sur la parthénocarpie des agrumes. Ces cultivars triploïdes ont ainsi un grand potentiel commercial. Cependant la fréquence de formation de triploïdes naturels chez les agrumes reste faible. Ces triploïdes peuvent être issus de manière spontanée lors de croisements entre diploïdes ou alors provoqués lors de croisements interploïdaux entre diploïdes et tétraploïdes.

I.3.2 Obtention de tétraploïdes pour les croisements interploïdaux 2x X 4x et 4x X

2x

I.3.2.1 Polyploïdes issus de biotechnologies

I.3.2.1.1 Colchicine

La technique la plus ancienne pour l'obtention de tétraploïdes est l'application de colchicine. Barrett (1974) et Tachikawa (1971) ont obtenu des plants chimériques suite à un traitement à la colchicine de bourgeons sur une vingtaine de clones de *Citrus*, d'hybrides et un clone de *Fortunella*. Afin d'éviter le développement de chimères, plusieurs auteurs ont combiné des techniques de culture *in vitro* et les traitements à la colchicine. Ainsi, Gmitter *et al.* (1991; 1990) ont obtenu des plants tétraploïdes non chimériques par culture d'embryons traités à la colchicine pour les orangers Hamlin et Ridge Pineapple ainsi que par culture de cals embryogènes issus de culture d'ovules non développés traités à la colchicine pour l'oranger Valencia et de tangelo Orlando.

Les variétés monoembryonnées d'agrumes ne présentent pas naturellement de tétraploïdes spontanés. Chez ces variétés, le traitement à l'aide d'un agent mitoclasique sur bourgeon est la seule technique permettant d'obtenir un autotétraploïde. Juarez *et al.* (2004) ont obtenu des clémentines tétraploïdes par traitement de branches à la colchicine. Wakana *et al.* (2005) ont obtenu des branches tétraploïdes par surgreffage de pousses de plusieurs variétés acides d'agrumes dont les bourgeons ont été traités à la colchicine. Les tétraploïdes issus de bourgeons ne présentent pas de phase de juvénilité contrairement aux autotétraploïdes issus de semis polyembryonnés ce qui est un avantage en amélioration des agrumes. Une nouvelle méthodologie, basée sur le greffage *in vitro* d'apex combinée à un traitement de la microgreffe à la colchicine et l'oryzaline a été mise en place (Aleza, *et al.* 2009). L'oryzaline est utilisée pour initier le dédoublement chromosomique et la déchimérisation est assistée par cytométrie en flux. Plusieurs tétraploïdes de clémentiniers et mandariniers ont été obtenus via cette méthode.

I.3.2.1.2 Hybridation somatique

Durant les 20 dernières années, de nombreux hybrides somatiques d'agrumes ont été créés par fusion de protoplastes. Depuis les premiers résultats obtenus par (Ohgawara, *et al.* 1991), l'hybridation somatique est devenue une composante importante dans les programmes

d'amélioration d'agrumes (Grosser et Chandler 2000; Grosser, *et al.* 2000). C'est un puissant outil de biotechnologie permettant la création de nombreux allotétraploïdes mais également de nouvelles combinaisons nucléo-cytoplasmiques, de cybrides diploïdes et d'hybrides asymétriques aneuploïdes. L'élargissement des ressources génétiques tétraploïdes est particulièrement intéressant pour la création de triploïdes. L'hybridation somatique rend possible la combinaison des gènes intéressants tout en contournant les problèmes d'incompatibilité, la stérilité gamétique et l'apomixie.

L'hybridation somatique consiste à fusionner deux cellules non reproductrices dépourvues de leurs parois pectocellulosiques après une digestion enzymatique et issues de deux parents génétiquement différents (Figure 9). Elle n'est possible que si les protoplastes d'au moins un parent sont totipotents et que les protoplastes sont obtenus en grande quantité (Bhojwani et Razdan 1996).

Chez les *Citrus*, la capacité de régénération d'une plante entière n'est conférée que par les protoplastes issus de cals embryogènes. En effet, dans les conditions de culture utilisées, les protoplastes issus de mésophylle foliaire de *Citrus* ne présentent pas d'aptitude à la régénération. La constitution de collection de cals embryogènes est donc un préalable à la mise en œuvre du programme d'hybridation somatique (Ollitrault et De Rocca Serra 1992). La stratégie alors utilisée, est de réaliser des hybridations somatiques entre des protoplastes issus de cals embryogènes et des protoplastes issus de feuilles. La totipotence est transmise au produit de fusion.

De nombreux programmes d'amélioration des agrumes utilisant l'hybridation somatique sont développés à travers le monde en particulier aux Etats-Unis, au Brésil, au Japon, en Chine, en Espagne, en Italie et en France (Grosser et Chandler 2000; Grosser, *et al.* 2000). De nos jours, plusieurs centaines d'hybrides somatiques allotétraploïdes d'agrumes sont publiés.

Trois techniques de fusion de protoplastes ont été développées, une chimique, une électrique et une mixte electro-chimique. Plusieurs produits peuvent être issus de ces fusions.

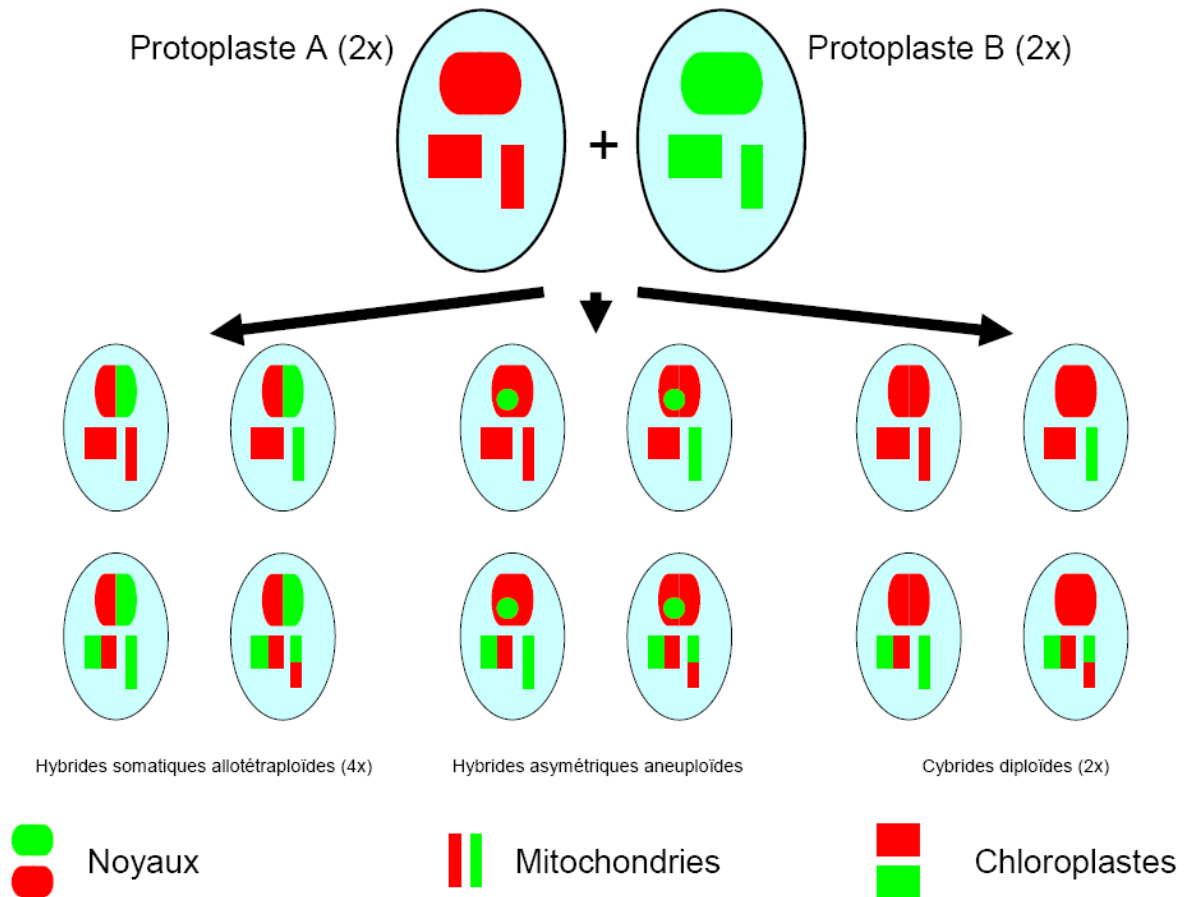


Figure 9: Produits de la fusion de protoplastes d'après Ollitrault *et al.* (2000)

1.3.2.1.2.1 Hybrides somatiques allotétraploïdes

Au niveau du génome cytoplasmique, ils contiennent soit les organites d'un des parents, soit différentes combinaisons des organites parentaux allant jusqu'à la présence de recombinaisons dans les mitochondries (Figure 9). La création d'hybrides somatiques allotétraploïdes a été développée pour la création de porte-greffe combinant différents gènes de résistances ainsi que pour augmenter le pool de géniteurs tétraploïdes, utilisables en amélioration variétale. En effet, face aux contraintes biotiques (Deng, *et al.* 1995) et abiotiques de plus en plus défavorables aux porte-greffe existants, de nouvelles voies de création de porte-greffe ont été étudiées. Les caractères de tolérance à ces différents stress sont présents chez les espèces du genre *Citrus* et des genres apparentés. La biologie de la reproduction des agrumes et la forte hétérozygotie de la plupart des cultivars et porte-greffe rendent difficile l'introgession de ces caractères. En revanche, l'hybridation somatique permet le cumul des caractères dominants de tolérance aux stress et des caractères de

résistance aux pathogènes tels que la *Tristeza* et le *Phytophthora* au sein d'un même génotype (Ollitrault, *et al.* 2000c).

La création d'hybrides somatiques allotétraploïdes a également permis d'élargir le pool des géniteurs tétraploïdes utilisés pour l'obtention de triploïdes aspermes dans les croisements entre variétés diploïdes et tétraploïdes (Ollitrault, *et al.* 2000). Plusieurs dizaines de combinaisons d'hybrides allotétraploïdes ont été obtenus (Grosser, *et al.* 2000). Les premières floraisons de certains d'entre eux ont permis d'aborder la seconde phase de cette stratégie en pollinisant des variétés diploïdes afin de générer des populations triploïdes.

Au-delà de l'élargissement du pool tétraploïde du complexe d'espèce, les hybrides obtenus représentent un outil original pour l'analyse des règles de l'hérédité des caractères phénotypiques chez les agrumes.

1.3.2.1.2.2 Cybrides

La création de cybrides consiste en l'obtention d'hybrides somatiques diploïdes associant le noyau d'un parent avec le génome cytoplasmique d'un autre parent, ou alors un génome cytoplasmique issu de la combinaison des organites des deux parents (Figure 9).

La création de cybrides a pour objectif principal de profiter des caractères d'intérêt agronomique liés à certains génomes cytoplasmiques, comme la stérilité mâle et certaines tolérances déterminées au niveau cytoplasmique (Barsby, *et al.* 1987; Pelletier, *et al.* 1982; Thomzik et Hain 1988; Varotto, *et al.* 2001). De plus, ces cybrides constituent des modèles originaux pour étudier le rôle du cytoplasme et de l'interaction nucléo-cytoplasmique sur le phénotype et les tolérances aux stress biotiques et abiotiques (Bassene, *et al.* 2008).

1.3.2.1.2.3 Hybrides aneuploïdes

Les aneuploïdes contiennent le génome nucléaire d'un des parents avec quelques chromosomes ou fragments d'ADN issus du second parent (Figure 9). Au niveau cytoplasmique, ils contiennent soit les organites d'un des parents, soit une combinaison des génomes cytoplasmiques parentaux. Chez les agrumes, l'hybridation asymétrique a été testée récemment avec succès (Bona, *et al.* 2009; Liu et Deng 2002; Xu, *et al.* 2007).

1.3.3 Stratégies pour la création de triploïdes aspermes

La sélection de lignées triploïdes est une des meilleures stratégies pour développer des cultivars aspermes. En effet, la triploïdie est généralement associée à la stérilité mâle et

femelle. Plusieurs méthodes dans différents pays (Froelicher, *et al.* 2005; Grosser, *et al.* 2000; Navarro, *et al.* 2004; Ollitrault, *et al.* 1998; Wu, *et al.* 2005) sont développées pour la création de cultivars d'agrumes triploïdes.

I.3.3.1 Sélection de triploïdes spontanés lors des croisements entre diploïdes

L'avènement du sauvetage d'embryons par culture *in vitro* et de la cytométrie en flux ont permis d'amplifier et d'accélérer la sélection de triploïdes, permettant ainsi leur intégration au sein de différents programmes de recherche. Le taux de triploïdes par génotype a été évalué dans les descendances, faisant ressortir un fort effet génotypique. Les mandariniers « Fortune » et « Wilking » peuvent donner de 10 à 30% de triploïdes dans leur semis tandis que les pamplemoussiers et le clémentinier ne donnent que très peu de triploïdes. De nombreux hybrides de mandariniers, tangors (mandarinier X orange) et tangelos (mandarinier X pomelo) triploïdes sont obtenus après des hybridations contrôlées (Aleza, *et al.* 2010; Navarro, *et al.* 2003).

I.3.3.2 Croisements entre diploïdes et autotétraploïdes

Des croisements entre diploïdes et autotétraploïdes ont été réalisés dans les 2 sens dans le but d'obtenir des hybrides triploïdes (Esen, *et al.* 1978; Oiyama, *et al.* 1982; Starrantino et Recupero 1981). Les croisements 4x X 2x se sont révélés être les plus avantageux en terme de taux d'embryons triploïdes obtenus (Soost et Cameron 1982). Cependant, la majorité des tétraploïdes disponibles sont polyembryonnés (Ollitrault, *et al.* 2008), limitant fortement ce sens de croisement. Ainsi, les croisements les plus exploités sont ceux entre fleurs de diploïdes monoembryonnés et pollen de tétraploïdes.

Des hybrides tétraploïdes ont été observés, en plus de triploïdes, lors de croisements 2x X 4x (Oiyama, *et al.* 1982). Ces tétraploïdes sont généralement corrélés avec une taille de pépin normale.

I.3.3.3 Croisements entre diploïdes et hybrides somatiques tétraploïdes

L'hybridation somatique permet de diversifier et d'enrichir le pool de tétraploïdes disponibles pour des croisements avec des diploïdes. Ainsi, plusieurs hybrides somatiques tétraploïdes intergénériques et interspécifiques ont été créés (Grosser et Chandler 2004; Grosser, *et al.* 2000; Ollitrault, *et al.* 2007; Wu, *et al.* 2005), afin de les utiliser dans les programmes de création de triploïdes. Des taux de fertilité pollinique relativement élevés sont observés chez

plusieurs hybrides somatiques tétraploïdes (Deng, *et al.* 1995). Parmi ces derniers, certains fleurissent de manière précoce par rapport aux autotétraploïdes. Oiyama (1991) a été le premier à réaliser un croisement entre la clémentine et l'hybride somatique d'oranger Trovita et *Poncirus trifoliata*. Les embryons issus de pépins avortés, après sauvetage *in vitro*, ont produit une majorité de plants triploïdes et quelques tétraploïdes. En Floride, des centaines de triploïdes issus de ces croisements sont en phase d'évaluation au champ (Grosser, *et al.* 2000).

I.3.3.4 Hybridation somatique entre des protoplastes diploïdes et haploïdes

Comme l'hybridation somatique entre protoplastes diploïdes, l'hybridation somatique entre protoplastes diploïdes et haploïdes consiste à additionner un génome haploïde à un génome diploïde pour générer des triploïdes. Cette méthode est limitée par le nombre restreint d'haploïdes. Toutefois, deux lignées haploïdes issues du clémentinier ont été additionnées avec succès à une dizaine de génotypes diploïdes cultivés (Ollitrault et al, 2007).

I.4 POLYPLOÏDIE CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES

I.4.1 Généralités

La polyploïdie est considérée comme une composante majeure dans l'évolution des plantes (Schultz 1980; Soltis et Soltis 1995). Entre 47% et 70% des espèces d'angiospermes auraient subi un ou plusieurs épisodes de polyploïdie (Soltis, *et al.* 2009). La polyploïdie est assez courante dans certaines familles comme les *Rubiaceae*, *Asteraceae*, *Iridaceae*, *Gramineae*. Elle est rare dans d'autres familles telles que les *Caesalpinaceae*, *Passifloraceae* et *Fagaceae*. Elle est définie comme la possession de trois chromosomes par lots ou plus. L'utilisation du terme "polyploïdes" est rendue plus compliquée par les recherches récentes indiquant que la plupart des organismes ont été polyploïdes à un moment dans leur histoire évolutive (Ramsey et Schemske 2002).

I.4.2 Origine et maintien des polyploïdes

Différents événements peuvent être à l'origine des polyploïdes, allant du dédoublement somatique du stock chromosomique lors de la mitose à la non réduction gamétique lors de la méiose en passant par la polyspermie (fécondation de l'œuf par deux noyaux mâles).

La première voie d'obtention de polyploïdes est le dédoublement somatique. C'est une réplication de l'ADN sans cytokinèse aux stades zygotique, embryonnaire ou méristématique

du cycle de vie d'une plante, qui aboutit à la production de tissus polyploïdes et, éventuellement, à une progéniture polyploïde (Rieseberg et Willis 2007). Le dédoublement chromosomique peut se produire soit dans le zygote donnant un individu polyploïde, soit de manière locale dans certains méristèmes apicaux donnant des chimères polyploïdes.

La formation de gamètes ($2n$) a été observée chez plusieurs espèces végétales. Elle est considérée comme un mécanisme important dans la formation des polyploïdes (Leitch et Leitch 2008). Ce phénomène est dû à la non réduction gamétique ou la restitution méiotique nucléaire lors de la micro ou de la mégasporogénèse entraînant la formation de gamètes $2n$. L'exemple classique de production directe de tétraploïdes par cette voie est celui de *Rhaphanobrassica*, issu d'une étape de fusion de deux gamètes non réduits (Grant 1981; Lewis 1980 a; Stebbins 1950). La production de gamètes non réduits est aussi connue comme étant assez courante chez les *Solanum* (Hieter et Griffiths 1999). L'étude des gamètes non réduits chez les plantes est, dorénavant, facilitée par l'utilisation de techniques telles que la cytométrie en flux ou les marqueurs moléculaires.

Enfin, les polyploïdes peuvent être issus de la polyspermie. La polyspermie consiste en la fécondation d'un gamète femelle par plus d'un gamète mâle. Elle est observée chez de nombreuses plantes. Cependant, sa contribution en tant que mécanisme pour la formation de polyploïdes est rare, sauf chez quelques orchidées (Vamosi et Dickinson 2006).

Divers facteurs favorisent la polyploïdie chez les plantes tels que le mode de reproduction, le type de fertilisation, le milieu de croissance ou la taille des chromosomes (Ramsey et Schemske 2002). Le taux de plantes polyploïdes est corrélé positivement avec une altitude et latitude élevées (Otto et Whitton 2000). Les polyploïdes se sont adaptés aux climats froids et aux changements ayant eu lieu à l'époque Pléistocène (Grant 1981). D'autres facteurs écologiques ont également une incidence sur la répartition des polyploïdes. En effet, les polyploïdes sont plus fréquemment distribués dans des sols humides et des prairies, par opposition à des habitats plus stables avec des sols plus secs (Grant 1981). Enfin, un mode de croissance durable favorise la polyploïdisation, par rapport à un mode de croissance annuel qui, au contraire, la défavoriserait (Clausen, *et al.* 1945).

I.4.3 Biologie de la reproduction et ségrégation chez les polyploïdes

I.4.3.1 Classification des polyploïdes

Il existe deux types principaux de polyploïdes. Les autopolyploïdes qui proviennent de la réunion de lots chromosomiques de la même espèce, tandis que l'allopolyploïdie provient de la réunion de plusieurs génomes différents (Soltis, *et al.* 2004; Soltis et Soltis 2000).

Les autopolyploïdes sont généralement caractérisés par la formation de multivalents pendant la méiose, par des ratios de ségrégation tétrasomiques, par un ralentissement de développement et par une fertilité réduite. Quant aux allopolyploïdes, ils possèdent généralement un comportement similaire à celui des diploïdes. Les multivalents ainsi que les ratios de ségrégation tétrasomiques sont très rarement observés.

Grant (1981) a noté qu'autopolyploïdes et allopolyploïdes sont les situations extrêmes d'une série « graduée » et que les principaux critères pour les distinguer sont le comportement chromosomique, la fertilité, les ratios de ségrégation et la morphologie.

I.4.3.2 Comportement méiotique

I.4.3.2.1 Chez les polyploïdes naturels

Chez les diploïdes, les chromosomes capables de s'apparier normalement lors de la méiose sont nommés « homologues ». Ainsi, les autopolyploïdes possèdent quatre chromosomes homologues pendant que les allopolyploïdes possèdent des chromosomes différents généralement issus de croisements interspécifiques. Ces chromosomes diffèrent, dans une certaine mesure, par la séquence d'ADN (différences alléliques causées par des substitutions de nucléotides), la structure et l'ordre des gènes (des réarrangements chromosomiques), et / ou leur nombre total (Ramsey et Schemske 2002).

La méiose comporte trois processus séquentiels : l'appariement, la recombinaison et enfin, la distribution chromosomiques (Singh 2003). L'appariement chromosomique a lieu pendant la prophase I. Chez les polyploïdes l'appariement chromosomique, entre chromosomes homologues ou homéologues, est déterminé lors de la synapsis. Il permet ainsi de déterminer les tendances de recombinaisons génétiques et la distribution des chromosomes à l'anaphase. En effet, l'appariement chromosomique favorise des échanges de segments de chromatides menant ainsi à une recombinaison génétique pendant la métaphase I. Enfin, les chromosomes

appariés se séparent en direction de deux pôles opposés des cellules mères lors de l'anaphase I.

La présence exclusive de chromosomes homologues chez les autopolyploïdes ainsi que d'au moins deux sets de chromosomes homéologues chez les allopolyploïdes, entraîne un déroulement différent de la méiose, et ainsi de la ségrégation, chez ces deux types de polyploïdes (Ramsey et Schemske 2002; Soltis et Riesberg 1986). Chez les autopolyploïdes, les sets de chromosomes homologues s'apparient de manière aléatoire durant la prophase et forment des bivalents, trivalents, quadrivalents lors de la métaphase. A l'inverse, la méiose des allopolyploïdes se caractérise généralement par des appariements non aléatoires et la formation de bivalents entre chromosomes homologues. Ce comportement méiotique des allopolyploïdes est attribué à la divergence entre chromosomes homéologues qui peut exister ou s'accroître à la formation des polyploïdes (Le Comber, *et al.* 2010). Ramsey et Schemske (2002) ont noté une fréquence de formation de multivalents (trivalents et quadrivalents) plus élevée chez les autopolyploïdes que chez les allopolyploïdes. Ce résultat supporte l'hypothèse de comportement chromosomique différent chez les auto et allopolyploïdes. Par ailleurs, la fréquence de formation de multivalents n'est pas suffisante pour établir la nature d'un polyploïde. En effet, la fréquence de formation de tétravalents est faible chez des lignées pures tétraploïdes de *Aegilops longissima* (Avivi 1976) et d' *Arabidopsis thaliana* (Santos, *et al.* 2003).

I.4.3.2.2 Chez les hybrides somatiques

L'hybridation somatique permet de combiner des génomes différents. Cette addition conduit généralement à un appariement chromosomique et une formation de gamètes irréguliers (Binsfeld, *et al.* 2001). Ces irrégularités méiotiques se manifestent d'autant plus que la distance génétique entre les parents de l'hybride somatique est grande. La méiose chez les hybrides somatiques se caractérise généralement par un faible appariement chromosomique entre chromosomes homéologues qui se traduit par la formation de structures de type bivalents (Chopra, *et al.* 1996). La formation de multivalents chez les hybrides somatiques, peut être indicative d'homologie intergénomique (Binsfeld, *et al.* 2001). Ces formations peuvent ainsi faciliter l'introgession de gènes de *Helianthus maximiliani* à *Helianthus annuus* (Binsfeld et Schnabl 2002) comme reporté pour des hybrides somatiques entre *Brassica* + *Sinapis* (Gaikwad, *et al.* 1996) et des espèces de *Nicotina* (Yemets, *et al.* 2000).

En plus de ces formations, l'élimination spontanée de chromosomes chez les hybrides somatiques est un phénomène commun, spécialement lorsque les parents appartiennent à des espèces relativement éloignées (Binsfeld, *et al.* 2001).

Cette large gamme d'affinités entre les chromosomes (formation de bivalents chez des autopolyploïdes et de multivalents chez des allopolyploïdes) contredit quelque peu la vision de classification des polyploïdes en allopolyploïdes à appariement préférentiel entre chromosomes homologues en bivalents et autopolyploïdes avec des chromosomes homologues ayant des chances égales de s'apparier à la méiose (Jannoo, *et al.* 2004). Ces configurations sont deux cas extrêmes de polyploïdes (Wu, *et al.* 2001). Plusieurs modèles intermédiaires affichant une combinaison des comportements des allo et autopolyploïdes ont été proposés pour plusieurs espèces polyploïdes (Allendorf et Danzmann 1997; Fjellstrom, *et al.* 2001; Jackson et Jackson 1996; Stift, *et al.* 2008).

I.4.3.3 Fertilité

I.4.3.3.1 Chez les polyploïdes naturels

Certains polyploïdes peuvent présenter une fertilité plus faible que leurs parents diploïdes (Ramsey et Schemske 2002). C'est le cas de certains néopolyploïdes dont la fertilité est estimée à 20% au niveau pollinique et de moitié au niveau femelle. La production de gamètes est un processus complexe qui se compose de deux étapes essentielles : la méiose et les événements post méiotiques. Le stade tétrade est le point de transition où la méiose s'achève et la production de gamète débute. La formation de tétrades anormales suite à des dysfonctionnements méiotiques (ségrégation chromosomique irrégulière, formation anormale du fuseau ou cytokinèse anormale) est la principale cause de la réduction de la fertilité chez les polyploïdes (Risso-Pascotto, *et al.* 2005; Risso-Pascotto, *et al.* 2004). Ainsi, les autopolyploïdes sont connus pour être moins fertiles que les allopolyploïdes (Briggs et Walters 1997). Cette différence s'explique par les fréquences de formation d'univalents et de multivalents, relativement élevées chez les autopolyploïdes. La réduction de la fertilité peut aussi avoir une origine épigénétique (Rieseberg 2001).

I.4.3.3.2 Chez les hybrides somatiques

La fertilité des hybrides somatiques dépend du comportement chromosomique adopté pendant la méiose. Ainsi l'hybridation somatique pourrait être à l'origine d'une restauration ou d'une induction de la fertilité. En effet, des hybrides somatiques très fertiles ont été obtenus par

fusion électrique de *Solanum melongena* avec *Solanum aethiopicum* (Daunay, *et al.* 1993; Isshiki et Taura 2003). Leur évaluation au champ a révélé qu'ils avaient une meilleure fertilité pollinique que leurs équivalents diploïdes sexués (30-85% contre 20-50%).

L'hybridation somatique peut être aussi responsable de la diminution de la fertilité. Un déroulement anormal de la méiose dû à l'apparition de chromosomes retardés et ainsi de micropollen est responsable de la formation de gamètes non viables chez un hybride somatique entre *Brassica rapa* et *Isatis indigotica* (Tu, *et al.* 2008).

I.4.3.4 Ségrégation allélique

I.4.3.4.1 Modèles de ségrégation

Généralement, en fonction de leurs origines, les polyploïdes se divisent en allopolyploïdes et autopolyploïdes. Ces derniers se différencient par leur mode de ségrégation allélique (Chenuil, *et al.* 1999) (Figure 10).

Chez un autotétraploïde, chaque chromosome s'apparie aléatoirement avec un de ses homologues, formant ainsi des bivalents ou tétravalents pendant la méiose. Cette configuration mène à une ségrégation tétrasomique où toutes les combinaisons alléliques sont produites en proportions égales (Stift, *et al.* 2008). Cette distribution est généralement indicative d'autotétraploïdie (Soltis et Soltis 1993).

Chez les allotétraploïdes, deux lots de chromosomes homéologues se distinguent, constitués chacun de chromosomes homologues. Si chaque chromosome s'apparie exclusivement avec son homologue, une ségrégation disomique a lieu. Cette dernière est généralement indicative d'allotétraploïdie (Ramsey et Schemske 2002; Soltis et Soltis 1993).

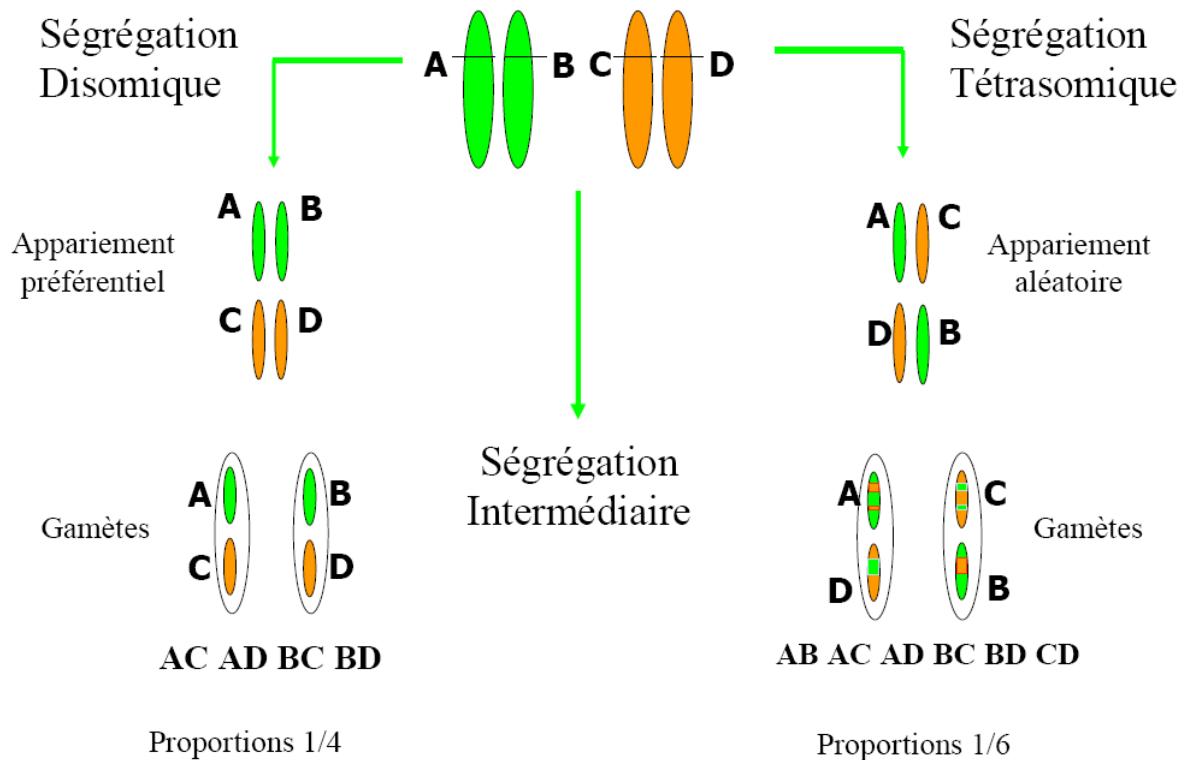


Figure 10: Les différents modes de ségrégation allélique chez un tétraploïde

Considérons un tétraploïde où chaque chromosome est marqué par un allèle différent « ABCD ». En cas de ségrégation tétrasomique, en absence de double réduction, les gamètes génotypés AB, AC, AD, CD, BD et BC sont produits à fréquences égales ($1/6$) (Stift, *et al.* 2008). La fréquence maximale de double réduction (α) est de $1/6$ et ne peut être atteinte que si des tétravalents sont formés lors de la méiose. Sous ce scénario, les précédents gamètes seront produits à fréquence égale de $1/6 - \alpha/6$ et des gamètes de double réductions (AA, BB, CC et DD) sont produits à une fréquence de $\alpha/4$.

En cas de ségrégation disomique, considérons les allèles A et B ainsi que C et D marquant des chromosomes homologues. A et B ou C et D ne se retrouveront en aucun cas au sein d'un même gamète. Sous un appariement AB/CD, les gamètes (AC, AD, BC et BD) seront produits à proportion égale ($1/4$) et aucune double réduction n'est possible.

Chez les autotétraploïdes, les quatre chromosomes homologues peuvent s'apparier de manière préférentielle (Ramsey et Schemske 2002; Soltis et Soltis 1993; Wolfe 2001). L'appariement peut, aussi, ne pas être préférentiel chez les allotétraploïdes (Sybenga 1996) donnant lieu à des recombinaisons entre chromosomes homéologues (Udall, *et al.* 2005). Une transition de ségrégation nécessite généralement plusieurs générations où la ségrégation n'est ni disomique ni tétrasomique mais intermédiaire. Une ségrégation intermédiaire peut avoir lieu chez des

hybrides interspécifiques fertiles, si les parents possèdent un degré d'homologie chromosomique (Stift, *et al.* 2008).

Dans les études de ségrégation, seules les hypothèses de disomie ou de tétrasomie ont longtemps été considérées, négligeant ainsi les hypothèses de ségrégation intermédiaire. Le développement des techniques de marquage moléculaire a facilité la caractérisation des polyploïdes. Soltis & Soltis (1993) répertorient 30 espèces allotétraploïdes et 14 espèces autotétraploïdes caractérisées à l'aide des marqueurs isoenzymatiques. L'utilisation des marqueurs microsatellites pour caractériser la ségrégation allélique de polyploïdes est relativement récente. Buteler *et al.* (1999) ont démontré une ségrégation polysomique chez les tétraploïdes et les hexaploïdes de *Ipomea batatas*. Froelicher *et al.* (2000) ont montré une ségrégation disomique chez *Clausena excavata*, espèce appartenant à la même sous-famille que les agrumes. Toutefois, plusieurs études ont suggéré une hypothèse de ségrégations intermédiaires comme explication à des résultats s'éloignant de la disomie et la tétrasomie mais ont manqué de méthode pour l'évaluer statistiquement (Allendorf et Danzmann 1997; Danzmann et Bogart 1982; Danzmann et Bogart 1983; Hickok 1978a; Hickok 1978b; Marsden, *et al.* 1987). Stift *et al.* (2008) sont les premiers à proposer une approche qui prend en charge les hypothèses de ségrégations intermédiaires, disomique, tétrasomique et la double réduction.

1.4.3.4.2 Ségrégation chez les hybrides somatiques

L'un des premiers objectifs du développement de l'hybridation somatique est de contourner les barrières d'incompatibilité. En effet, cette technique permet l'exploitation large des pools géniques sexuellement incompatibles. Les hybrides obtenus sont généralement considérés comme hybrides somatiques allopolyploïdes. Ainsi, ces derniers sont supposés avoir une ségrégation de type disomique (Chenuil, *et al.* 1999). Cependant plusieurs hybrides somatiques affichent une ségrégation non disomique (Barone, *et al.* 2002; Bousalem, *et al.* 2006; Toppino, *et al.* 2008). En effet, une ségrégation polysomique peut être observée chez un allopolyploïde (naturel ou issu d'hybridation somatique) si ses parents sont relativement proches (homologie génétique) mais suffisamment différents pour acquérir un statut d'espèce et particulièrement dans les systèmes sexuellement compatibles (Pairen et Jacquemart 2005; Ramsey et Schemske 2002; Stift, *et al.* 2008).

I.4.3.4.3 Transmission de l'hétérozygotie

Les hybrides somatiques sont généralement très hétérozygotes puisqu'ils sont issus de l'addition de 2 parents différents, chacun des parents pouvant être lui-même hétérozygote. Ils peuvent porter 4 allèles différents pour un même locus. Ainsi leurs gamètes diploïdes sont également très hétérozygotes, que ce soit dans le cadre d'une méiose de type tétrasomique ou disomique. Si au niveau interspécifique, la différenciation chromosomique est importante entre les deux parents de l'hybride somatique, cela conduit à une ségrégation disomique. Dans ce cas pour un hybride somatique ABCD, les gamètes diploïdes transmettent essentiellement l'hétérozygotie interspécifique (AC, AD, BC ou BD). Dans les autres cas, les gamètes diploïdes hétérozygotes transmettent aussi bien l'hétérozygotie intra-parentale (AB ou CD) que l'hétérozygotie inter-parentale (AC, AD, BC ou BD).

La formation de tétravalents entraîne donc une grande diversité inter gamétique. Un individu tétraploïde peut posséder jusqu'à quatre allèles pour un même locus. Au niveau des populations, l'allotétraploïde assure une transmission complète de l'hétérozygotie interspécifique (dans le cadre de méiose de type disomique) alors que chez un diploïde la fixation génétique progresse à chaque génération au sein de population de taille limitée. Cette stabilité de l'hétérozygotie pourrait être l'un des éléments clefs de l'adaptation des polyploïdes dans des conditions extrêmes. Ces dernières entraînent en effet des réductions fréquentes de la taille efficace des populations généralement morcelées, ce qui est associé à une consanguinité élevée chez les diploïdes. Il est ainsi remarquable que près de 75 % des taxons spécifiques de l'arctique soient des polyploïdes (Brochmann, *et al.* 2004).

I.4.4 Polyploïdes et expression génotypique et phénotypique

La polyploïdie a joué un rôle important dans l'évolution des génomes des plantes supérieures (Soltis et Soltis 1993; Soltis, *et al.* 2004). Effectivement, plusieurs études réalisées sur une multitude d'espèces polyploïdes rapportent des changements génétiques et épigénétiques importants chez plusieurs espèces suite à une polyploïdisation (Chen 2007; Gaeta, *et al.* 2007; Wang, *et al.* 2004). De plus, la polyploïdisation permet l'apparition de phénotypes intermédiaires aux parents mais aussi de phénotypes tout à fait nouveaux suggérant une expression non additive des gènes. Les techniques moléculaires de plus en plus appropriées (analyses microarray, méthylationssensitive AFLP (MSAP), cDNA-SSCP, RLGSM...) permettent de pointer les mécanismes intervenant dans l'expression génomique et phénotypique chez les polyploïdes. Plusieurs études ont souligné l'existence d'une expression

modulée des loci dupliqués chez les polyploïdes (Adams, *et al.* 2003; Comai 2000; Shaked, *et al.* 2001). Ces changements d'expression génétique peuvent impliquer différents mécanismes, incluant les modifications d'expression liées au dosage allélique, l'altération des réseaux de régulation de l'expression génétique ou des changements structuraux génétiques et épigénétiques (Osborn, *et al.* 2003; Riddle et Birchler 2003).

I.4.4.1 Polyplœidisation et modifications génétiques

Les modifications de l'expression génétique peuvent avoir un impact profond sur l'aptitude des plantes quand elles aboutissent à l'apparition de nouveaux phénotypes. Des modifications génétiques, telles que des réarrangements chromosomiques ou des éliminations de séquences génomiques, peuvent apparaître suite à la polyplœidisation (Feldman, *et al.* 1997; Shaked, *et al.* 2001; Tate, *et al.* 2006). Les techniques de marquage chromosomique (GISH, FISH) ont permis d'observer d'importants réarrangements chromosomiques chez des allopolyploïdes de *Nicotina tabacum* et *Avena maroccana* (Leitch et Bennett 1997; Soltis et Soltis 1999; Wendel 2000). Ces réarrangements chromosomiques ne sont pas observés chez l'ensemble des polyploïdes. En effet, certains polyploïdes, notamment le coton, n'en subissent aucun (Hegarty et Hiscock 2008; Liu, *et al.* 2001).

I.4.4.2 Polyplœidisation et modifications épigénétiques

Des niveaux d'expression inégaux ont été observés chez les polyploïdes. Effectivement, des analyses ADNc AFLP chez des allopolyploïdes de *Tragopogon* ont révélé l'extinction de 5% et une modification de l'expression de 4% des gènes examinés en comparaison avec leurs parents diploïdes (Soltis, *et al.* 2004). Des variations de périodes de floraison, liées à des modifications des niveaux d'expression génique, ont aussi été observées chez des allopolyploïdes de *Brassica napus* (Pires, *et al.* 2004). Chez plusieurs tétraploïdes d'*Arabidopsis*, l'extinction de gènes (Gene silencing) est responsable des diverses variations phénotypiques et de l'instabilité qui y ont été observées (Comai 2000). Ces variations se sont également révélées être liées à des modifications des taux de méthylation de l'ADN (Wang, *et al.* 2004). Ces modifications épigénétiques (méthylation des cytosines, acétylation des histones...) sont aussi responsables des modifications de l'expression génétique chez les polyploïdes (Chen 2007; Osborn, *et al.* 2003; Wang, *et al.* 2004). Plusieurs événements indépendants d'hybridation ont conduit à des fortes similarités des régions affectées par la méthylation du génome, laissant penser à un reformatage épigénétique non aléatoire chez les polyploïdes (Adams, *et al.* 2004; Salmon, *et al.* 2005; Wang, *et al.* 2004).

I.5 COMPORTEMENT MEIOTIQUE ET EXPRESSION GENOMIQUE ET PHENOTYPIQUE CHEZ LES HYBRIDES SOMATIQUES D'AGRUMES

I.5.1 Comportement méiotique des hybrides somatiques d'agrumes

Chez les hybrides somatiques d'agrumes, la relation entre les génomes parentaux exerce une grande influence sur les processus d'appariement chromosomiques et de recombinaison durant la méiose, et ainsi sur l'apparition d'irrégularités méiotiques et la viabilité des gamètes (Del Bosco, *et al.* 1999). Cependant, des études cytologiques du comportement méiotique des hybrides somatiques d'agrumes n'ont été réalisées que pour quelques hybrides (Chen, *et al.* 2004; Del Bosco, *et al.* 1999). La méiose des hybrides somatiques d'agrumes se caractérise par la formation d'univalents et multivalents. La formation de ces structures peut s'expliquer par la grande compatibilité sexuelle et la forte homologie génomique au niveau interspécifique entre les diverses espèces (Chen, *et al.* 2004).

Cependant, chez un hybride somatique intergénérique, l'homologie génomique entre les deux parents est moindre, impliquant un comportement méiotique semblable à celui d'un amphidiploïde se manifestant par la formation de bivalents (Chen, *et al.* 2004).

La formation d'univalents chez les hybrides somatiques d'agrumes est similaire à celle décrite chez la majorité des espèces d'agrumes par Raghuvanshi (1962). Ces univalents sont responsables de la formation de structures appelées « micronoyaux » ou de polyades (Del Bosco, *et al.* 1999). La fréquence de formations de ces structures est négativement corrélée à la viabilité pollinique de ces hybrides. Cependant, chez un hybride somatique entre Citronnier Femminello et Oranger Valencia, la viabilité et la germination pollinique ne sont pas affectées malgré un fort taux d'univalents formés à la méiose (Del Bosco, *et al.* 1999). Ces résultats laissent à penser que ces polyades ou micronoyaux seraient viables et capables de féconder, donnant ainsi divers niveaux de ploïdie dans les descendances des croisements impliquant ces hybrides somatiques. En effet, lors de croisements de type $2x \times 4x$, en plus de triploïdes, des tétraploïdes ont été observés dans les descendances (Esen et Soost 1972; Oiyama, *et al.* 1982). Ces tétraploïdes sont issus de la fécondation d'un gamète femelle non réduit par un gamète mâle diploïde (Ferrante, *et al.* 2009).

I.5.2 Expression génomique et phénotypique chez les hybrides somatiques d'agrumes

L'hybridation somatique est un outil permettant de comprendre les mécanismes contrôlant la transmission des caractères phénotypiques chez les allopolyploïdes. Plusieurs évaluations agronomiques sont en cours chez les agrumes, pour un ensemble d'hybrides somatiques interspécifiques et intergénériques, pour y étudier l'hérédité de ces caractères (Grosser et Chandler 2004; Grosser, *et al.* 2007; Guo, *et al.* 2004; Ollitrault, *et al.* 2000b).

De nombreuses études ont porté sur la transmission des caractères liés à la qualité chez les hybrides somatiques d'agrumes tels que les polyphénols de la pulpe des fruits (Tusa, *et al.* 2007) ou les composés aromatiques des feuilles (Alonzo, *et al.* 2000; Del Bosco, *et al.* 1998; Gancel, *et al.* 2006; Gancel, *et al.* 2003; Gancel, *et al.* 2005a; Gancel, *et al.* 2005b). Ces études révèlent une forte variabilité chez les hybrides somatiques en comparaison avec leurs parents. En effet, des hybrides somatiques combinant le génome du mandarinier Willowleaf à ceux du limettier mexicain, de l'oranger, du pomelo, du kumquat, du poncirus ou des citronniers Eureka et Lac, affichent un profil de composés aromatiques de feuille plus proche du mandarinier (Gancel, *et al.* 2003; Gancel, *et al.* 2005a). Cette dominance du mandarinier a aussi été observée au niveau de l'expression du protéome chez deux hybrides somatiques (Gancel, *et al.* 2006). Bassene *et al.* (2009a) ont étudié l'héritabilité de plusieurs traits qualitatifs au niveau d'un hybride somatique de mandarinier et citronnier et ont montré une forte dominance du citronnier au niveau des acides, une dominance partielle de celui-ci pour le saccharose et le glucose ainsi qu'une dominance du mandarinier au niveau du fructose ainsi que pour la majorité des composés aromatiques. Cependant, contrairement aux résultats observés avec le mandarinier, aucune dominance n'a été clairement observée pour les huiles essentielles chez six hybrides somatiques entre limettier, citronnier, oranger, cédratier et pomelo (Gancel, *et al.* 2005a). Des modifications importantes ont été observées au niveau de l'expression du protéome chez deux hybrides somatiques, interspécifique entre mandarinier et limettier et intergénérique entre mandarinier et kumquat (Gancel, *et al.* 2006). Les analyses réalisées par électrophorèse bidimensionnelle mettent en évidence des phénomènes de « silencing » affectant particulièrement les parents limettier et kumquat avec 75% des spots éteints chez les hybrides. En revanche, ces hybrides somatiques affichent de nombreux nouveaux spots : 14% pour l'hybride mandarinier + limettier et 29% pour l'hybride mandarinier + kumquat, dont 5 communs aux deux hybrides somatiques (Gancel, *et al.* 2006). L'étude de l'expression des gènes de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes de la pulpe,

chez un hybride somatique de mandarinier et citronnier, montre un profil d'expression non additive des caroténoïdes. En effet, Bassene *et al.* (2009b) ont observé une faible expression du citronnier sur le profil d'expression des gènes présents en amont de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (CitDxs, CitZds et CitLcy-b), et une dominance du mandarinier sur l'étape clé de formation des β,β -xanthophylles (CitHy-b) avec une surexpression transgressive de CitNced responsable du catabolisme des caroténoïdes en faveur d'une production d'ABA.

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'élaboration du phénotype de l'hybride allotétraploïde a pu être complétée par une analyse globale du transcriptome de la pulpe par microarray (cDNA de 20K) (Bassene, *et al.* 2010). Les données d'expression de l'hybride allotétraploïde comparées à celles des parents ont permis de mettre en évidence une fréquence relativement élevée d'expression génomique non additive chez WLM + EUR 4x, en concordance avec les différentes observations de dominances observées aux niveaux morphologiques et biochimiques. Une dominance globale du transcriptome de mandarinier a par ailleurs été observée, liée à la répression quasi systématique de l'expression chez l'hybride somatique des gènes sous exprimés chez le mandarinier en comparaison du citronnier.

Au niveau agronomique, les hybrides somatiques sont généralement plus vigoureux que les autotétraploïdes. Ces tétraploïdes, utilisés comme porte-greffe, confèrent généralement une croissance réduite au greffon en comparaison avec leurs parents diploïdes (Grosser et Chandler 2000). Dans la même mesure, une amélioration de la tolérance/résistance aux nématodes (Grosser, *et al.* 2007) et au stress salin et hydrique (Mouhaya, *et al.* 2010; Saleh, *et al.* 2008) est observée chez les hybrides somatiques par rapport à leurs parents diploïdes.

II. OBJECTIFS DE LA THESE

Les nouvelles stratégies d'amélioration des agrumes sont basées sur la manipulation de la ploïdie. Au niveau des porte-greffe, l'objectif appliqué est de réunir des caractères dominants de tolérances aux facteurs biotiques et abiotiques, ainsi que l'apomixie chez des hybrides somatiques allotétraploïdes. Au niveau des cultivars, la sélection de triploïdes est un moyen de répondre à l'objectif appliqué de production de fruits de qualité aspermes. Une des voies de création de triploïdes est l'hybridation entre diploïdes et tétraploïdes. Le pool de polyploïdes naturels est toutefois relativement restreint et l'hybridation somatique a permis d'augmenter significativement leur nombre disponible pour les programmes d'amélioration variétale.

Théoriquement, le croisement entre diploïdes et tétraploïdes est la méthode qui devrait être la plus efficace pour produire des triploïdes (100 %). Cependant, les premiers résultats des croisements 2x et 4x obtenus par hybridation somatique, réalisés par d'autres équipes ainsi que dans le cadre du programme d'amélioration du CIRAD, se sont avérés en deçà des résultats attendus. En effet, peu de graines ont été obtenues et parmi les plantules régénérées, différents niveaux de ploïdie (2x, 3x et 4x) ont été observés dans la descendance. Les résultats obtenus soulèvent ainsi de nouvelles questions de recherches sur la biologie de reproduction des hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes et la transmission de ces caractères entre parents et hybrides somatiques. Ces hybrides sont utilisés en tant que parents dans un objectif de création de triploïdes. Ainsi, il est nécessaire de comprendre la transmission des caractères liés à la reproduction comme l'apomixie, la fertilité et la viabilité pollinique. Plusieurs études ont été réalisées sur la transmission des caractères chez les hybrides somatiques d'agrumes. Ces études ont porté principalement sur la transmission des déterminants de la qualité chez les hybrides somatiques d'agrumes. Aucune étude approfondie n'a été réalisée sur la transmission des différentes composantes du système de reproduction chez les hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes.

De plus, il est particulièrement important de comprendre l'origine des variations du niveau de ploïdie dans la descendance et d'étudier la ségrégation allélique d'hybrides somatiques allotétraploïdes d'agrumes afin de vérifier si elle est de type disomique ou tétrasomique. En effet, la transmission de l'hétérozygotie parentale dépend du mode de ségrégation, et peut favoriser ou non l'introggression de caractères agronomiques importants. La connaissance de mode de ségrégation doit permettre de prédire la constitution génétique des gamètes et ainsi

contribuer à une meilleure définition des stratégies d'améliorations variétales des agrumes triploïdes et à terme, à une meilleure prévision du phénotype des hybrides polyploïdes en fonction de celui de leurs géniteurs. L'objectif principal de cette thèse est d'analyser les différents facteurs du processus de reproduction influant sur la structure génotypique des populations hybrides lors de croisements entre diploïdes et allotétraploïdes.

De la gamétogenèse à l'obtention de plantules viables, ce travail de thèse s'intéresse plus particulièrement aux questions de recherches suivantes qui touchent aux différentes phases du processus de reproduction :

- La fertilité ou la stérilité des parents se transmet-elle chez les hybrides somatiques? L'hybridation somatique permet-elle de restaurer la fertilité ?
- Comment se transmet l'apomixie vs la zygotie ainsi que la monoembryonie vs la polyembryonie chez les hybrides somatiques ? Peut-on envisager de les utiliser comme parent femelle ?
- Quelle est l'origine génétique des hybrides autres que triploïdes issus de croisement $2x \times 4x$? Un hybride somatique tétraploïde d'agrumes est-il capable de former des gamètes haploïdes ?
- Quel est le fonctionnement méiotique des hybrides allotétraploïdes et son implication sur la structure génétique des gamètes (ploïdie, ségrégation de type disomique ou tétrasomique) ? Ce dernier point est essentiel dans la gestion de l'hétérozygotie parentale et donc dans l'efficacité d'introggression de caractères agronomiques importants.

Afin de répondre aux questions précédentes, nous avons réalisé sur différents hybrides somatiques interspécifiques et un hybride intergénérique d'agrumes et leurs parents (i) une étude phénologique, une étude de la fertilité mâle et femelle, (ii) une évaluation du taux de polyembryonie et du nombre d'embryons d'origine zygotique ou nucellaire, (iii) une étude de l'origine des diploïdes, triploïdes et des tétraploïdes, obtenus dans la descendance des croisements entre diploïdes et tétraploïdes, par marqueurs SSR (iiii) une étude de la méiose chez deux hybrides somatiques, interspécifique et intergénérique, ainsi qu'une étude de la ségrégation allélique de ces deux hybrides somatiques via l'analyse de leurs descendances triploïdes, issues de croisements $2x \times 4x$, à l'aide des marqueurs SSR .

III. MATERIELS ET METHODES

III.1 MATERIEL VEGETAL

Le Cirad a obtenu différentes combinaisons d'hybrides somatiques par fusion de protoplastes à partir de génotypes représentant une part importante de la diversité dans le genre *Citrus* et *Poncirus*. Ces génotypes, *Citrus aurantifolia* (Christm.)Swing. cv Mexicaine (limetier), *Citrus paradisi* Macf. cv Star Ruby (pomelo), *Citrus sinensis* (L.)Obs. cv Shamouti (oranger), *Citrus reticulata* Blanco cv Commune (mandarinier), *Citrus medica* L. cv Corsica (cédratier), *Citrus limon* (L) Burm cv Eureka (citronnier) et *Poncirus trifoliata* L. cv Pomeroy ont servi de parents et ils ont permis l'obtention des hybrides somatiques listés dans le tableau 1. La caractérisation moléculaire du noyau et du cytoplasme de ces hybrides somatiques a été préalablement réalisée (Bassene, *et al.* 2009a; Gancel, *et al.* 2003; Gancel, *et al.* 2005b).

A partir de ce matériel végétal, trois études ont été effectuées. La biologie de la reproduction a été étudiée chez ces huit hybrides somatiques d'agrumes et leurs parents diploïdes (Tableau 1).



**Figure 11: Arbres des hybrides somatiques plantés au champs à la station de recherche de San Giuliano ;
a : Hybride somatique WLM+EUR. b : hybride somatique WLM+PON**

Deux combinaisons, interspécifique et intergénérique, respectivement mandarinier + citronnier (WLM+EUR) (Figure 11a) et mandarinier + *Poncirus* (WLM+PON) (Figure 11b) ont été sélectionnées pour analyser la ségrégation allélique. Deux populations en ségrégation ont été préalablement obtenues par croisements avec le pamplemoussier *Citrus maxima* (Burm.) Merr. « Chandler ».

Enfin, l'origine génétique des variations de ploïdie a été étudiée sur des descendances issues de trois croisements 2x x 4x (Tableau 2)

Tableau 1: Les hybrides somatiques allotétraploïdes ainsi que leurs origines nucléaire et cytoplasmique et leurs parents diploïdes

| Hybrides somatiques | Parents 2x | Abréviation | Nom latin | Référence SRA | Caractérisation HS | | |
|---------------------|-----------------------|-------------|------------------------|---------------|--------------------|------|--------|
| | | | | | Noyau | Mito | Chloro |
| WLM+SRG | Mandarine Willow leaf | WLM | <i>C. reticulata</i> | SRA 133 | HS | SRG | SRG |
| | Pomelo Star Ruby | SRG | <i>C. paradisi</i> | SRA 293 | | | |
| WLM+SHO | Mandarine Willow leaf | WLM | <i>C. reticulata</i> | SRA 133 | HS | SHO | SHO |
| | Orange Shamouti | SHO | <i>C. sinensis</i> | SRA 299 | | | |
| WLM+EUR | Mandarine Willow leaf | WLM | <i>C. reticulata</i> | SRA 133 | HS | WLM | WLM |
| | Citron Eureka | EUR | <i>C. limon</i> | SRA 4 | | | |
| WLM+PON | Mandarine Willow leaf | WLM | <i>C. reticulata</i> | SRA 133 | HS | WLM | PON |
| | Poncirus pomegranate | PON | <i>P. trifoliata</i> | 110081 | | | |
| SRG+MEL | Pomelo Star Ruby | SRG | <i>C. paradisi</i> | SRA 293 | HS | MEL | SRG |
| | Lime mexicaine | MEL | <i>C. aurantifolia</i> | SRA 140 | | | |
| SRG+COC | Pomelo Star Ruby | SRG | <i>C. paradisi</i> | SRA 293 | HS | SRG | SRG |
| | Cédrat Corse | COC | <i>C. medica</i> | SRA 613 | | | |
| MEL+SHO | Lime mexicaine | MEL | <i>C. aurantifolia</i> | SRA 140 | HS | MEL | MEL |
| | Orange Shamouti | SHO | <i>C. sinensis</i> | SRA 299 | | | |

HS : hybride somatique

Tableau 2: Croisements ayant servi de support à l'étude de l'origine des variations de ploïdie dans les descendances

| Origine des variations de la ploïdie | Parent diploïde | Hybride somatique |
|--------------------------------------|---------------------|-------------------|
| | Citronnier Eureka | SRG+COC |
| | Citronnier Eureka | MEL+SHO |
| | Mandarinier Fortune | WLM+SRG |

L'ensemble de ces variétés est greffé sur volkameriana (*Citrus limonia* Obs.) avec 3 répétitions par variété et planté aléatoirement sur une parcelle homogène de la Station de Recherches Agronomiques Inra/Cirad de San Giuliano (Corse).

III.2 METHODES

III.2.1 Croisements contrôlés

Les fleurs du parent mâle sont récoltées au stade bouton craquant. Les pétales et les pistils sont ôtés. Les étamines sont placées 24 heures sous hotte à flux laminaire afin de les rendre

déhiscentes. Pour les génotypes utilisés en tant que femelle, les fleurs, au stade bouton craquant, sont castrées. Les fleurs femelles sont pollinisées à l'aide des étamines déhiscentes préalablement récoltées puis étiquetées et recouvertes d'un sac en papier.

III.2.1.1 Extraction des pépins et mise en culture des embryons

Six à neuf mois après la pollinisation, les fruits sont récoltés. Les pépins sont extraits des fruits et dénombrés. Deux types de pépins sont observés, les normaux et les pépins de très petite taille et dénombrés distinctement (Fig.). Les pépins sont trempés dans de la pectinase 0.2 % (p/v) pendant une heure. Les graines sont désinfectées pendant quinze minutes dans de l'hypochlorite de sodium à 3,6 % Chlore puis rincées trois fois cinq minutes dans de l'eau distillée stérile.

III.2.1.2 Sauvetage d'embryons

Les embryons sont placés dans des tubes à essai contenant du milieu de culture Murashige et Tucker (Murashige et Tucker 1969), additionné d' 1 mg.l^{-1} de GA3. Sur chaque tube ont été marquées l'origine de l'embryon (parents) et la date de mise en culture, avant de les placer dans la chambre de culture à 26° C.

Les plants obtenus ont été greffés sur des porte-greffe *Citrus volkameriana* (*C. limonia* Osbeck).

III.2.2 **Caractérisation génétique du matériel végétal**

III.2.2.1 Evaluation de la ploïdie

L'évaluation du niveau de ploïdie des différents génotypes étudiés est réalisée via la cytométrie en flux et le comptage chromosomique.

III.2.2.1.1 Cytométrie en flux

Un échantillon de feuilles est prélevé sur chaque plant afin d'évaluer son niveau de ploïdie à l'aide d'un cytomètre de type Partec PA-I. L'échantillon est haché, à l'aide d'une lame de rasoir, en présence d'une portion de feuille d'un témoin interne diploïde et de 200 μL de tampon d'extraction nucléaire (Partec, Cystain UV Précise P *Nuclei Extraction Buffer*). La solution obtenue est filtrée à l'aide d'un filtre Partec de 30 μm et le filtrat recueilli dans un tube de 10 ml. 400 μL d'une solution de coloration, contenant du DAPI (Partec, Cystain UV

Précise P *Staining Buffer*) sont additionnés au filtrat. Ce fluorochrome se fixe spécifiquement à l'ADN. La quantité d'ADN est évaluée par l'intensité de la fluorescence réémise par les noyaux sous excitation UV (365 nm) et les résultats obtenus sont retranscrits sur un histogramme. La position, sur l'axe des abscisses, des pics obtenus, est proportionnelle à la quantité d'ADN et donc à la ploïdie.

III.2.2.1.2 Comptage chromosomique

De très jeunes feuilles en croissance sont sélectionnées afin de réaliser le comptage de chromosomes. Les feuilles récoltées sont traitées avec une solution à 0,04% d'hydroxyquinoline pendant 4 h à température ambiante, puis 4 h à 4°C. Les feuilles sont ensuite fixées pendant 48 h dans un mélange éthanol/acide acétique (3:1) et stockées dans 70% d'éthanol à 4°C. La préparation des lames pour le comptage chromosomique est effectuée tel que décrit par (D'Hont, *et al.* 1996). La coloration est réalisée par DAPI. L'observation des chromosomes se fait à l'aide d'un microscope Nikon 80i à fluorescence.

III.2.2.2 Caractérisation moléculaire des hybrides somatiques et des descendances

Les hybrides somatiques, leurs descendances ainsi que les parents sont étudiés à l'aide de marqueurs moléculaires, afin de déterminer l'origine de leurs génomes nucléaires.

III.2.2.2.1 Extraction d'ADN

L'ADN des plants est extrait à partir de 100 mg de feuilles selon un protocole modifié, dérivé de la méthode décrite par Gawel et Jarret (1991). Les feuilles sont lyophilisées dans un Lyophilisateur BETA 1-8 LD (CHRIST) dans des tubes Eppendorf 2 ml. Le broyage est réalisé en utilisant des billes en acier inoxydable (VWR, France) et un broyeur Tissue Lyser II (Qiagen) à raison de 30 Hz pendant 2 minutes. 700 µL de tampon d'extraction [2% (p/v) MATAB, 1,4M NaCl, 0,2 M Tris-HCl pH=8, 50mM EDTA, 1% (p/v) PVP, 0.5% Bisulfite de Sodium (p/v)] sont additionnés au broyat obtenu. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 30 min à 65°C. A température ambiante, 500 µL de chloroforme/alcool iso amylique (24/1; v/v) sont rajoutés puis le mélange est soumis à une agitation douce (agitateur rotatif) pendant 10 min. Après une centrifugation de 5 min à 8000 g, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube Eppendorf avec 500 µL d'isopropanol, afin de précipiter l'ADN. Après une centrifugation de 10 min à vitesse maximale, le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est séché avant de lui rajouter 50 µl d'eau déminéralisée stérile.

III.2.2.2.2 Amplification des ADN par PCR avec des amorces non marquées

Les ADN sont amplifiés par PCR utilisant des amorces nucléaires de type SSR avec un thermocycler primus 96 plus MWG Biotech.

L'amplification est réalisée sur un volume total de 20 μL contenant 5 μL d'ADN à 2 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ainsi que 15 μL du mélange PCR composé de Tampon 1X (Eurogentec), de 1,5 mM MgCl_2 (25mM), de 0,2 mM dNTP, de 0,4 μM de chaque amorce et de 0,8 u Taq Polymérase (GoldStar® DNA polymerase, Eurogentec). Le programme d'amplification se compose des cycles suivants : un cycle de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 5 min ; puis 40 cycles d'amplification [dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 30s - hybridation des amorces à température variable selon les amorces (50°C, 55°C) pendant 30s - élongation à 72°C pendant 1 min] ; et enfin une élongation finale à 72°C pendant 4 min].

III.2.2.2.3 Marqueurs SSR nucléaires

L'ADN des hybrides somatiques, des descendances et des parents utilisés dans les croisements est amplifié à l'aide de marqueurs nucléaires SSR. Ces couples d'amorces sont sélectionnés pour leur polymorphisme entre les parents. Cette analyse permet d'identifier l'origine allélique pour chaque hybride par comparaison avec les profils de leurs parents.

III.2.2.2.4 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les produits PCR sont séparés sur un gel dénaturant de polyacrylamide 5%, urée 7M). Après amplification, 60 μL de bleu de séquençage (98% formamide (v/v), 0,25% xylène cyanol(p/v), 0,25% bleu de bromophenol (p/v), 10mM EDTA pH=8) sont rajoutés à chaque échantillon.

Le gel est placé dans une cuve contenant du tampon TBE 0.5x (TBE 5x : 54 g Tris base, 27,5 g d'acide borique, 20 mL d'EDTA 0,5 M pH8, eau distillée qsp 1L) pour une prémigration de 30 min sous une puissance constante de 60 W. Les échantillons d'ADN dénaturés (5min à 94°C) sont déposés sur le gel. La migration est relancée dans les mêmes conditions que la pré-migration pour une durée variable en fonction de la taille des fragments attendus.

La révélation des fragments d'ADN se fait par coloration au nitrate d'argent comme décrit par (Beidler, *et al.* 1982). L'ADN est fixé dans un bain d'alcool à 10 % pendant 30 min puis dans un bain d'acide nitrique 1 % pendant 5 min ; le gel est ensuite lavé dans deux bains successifs d'eau ultra pure (18 M Ω) pendant 5 min. La coloration est effectuée dans un bain de nitrate

d'argent 0,2% (p/v) durant 30 min ; puis les fragments d'ADN sont révélés par 2 bains successifs avec une solution de carbonate de sodium (NaCO_3 30g.l⁻¹, formaldéhyde 600 µl.l⁻¹). La révélation est stoppée par un bain d'acide acétique à 5% pendant 1min ; puis le gel est rincé à l'eau déminéralisée et recouvert d'un film.

III.2.2.2.5 Electrophorèse capillaire

Les polymorphismes de longueur des produits PCR sont détectés par électrophorèse capillaire sur un séquenceur Beckman-Coulter CEQ 8800. Les amorces F utilisées sont marquées en 5' par des fluorochromes WellRED Fluorescent dye (PAdye2, PAdye3 et PAdye4) (Sigma Aldrich).

Le protocole de préparation des échantillons est décrit par le constructeur sur l'adresse suivante <http://www.beckmancoulter.com/literature/Bioresearch/608113-AK.pdf>

Les produits PCR, obtenus suite à l'amplification de trois amorces marquées différemment, sont ainsi mélangés de telle sorte que les fragments marqués avec Dye4 soit dilués 2 fois plus que ceux marqués avec le Dye 3 et 4 fois plus que ceux marqués avec le Dye2. 4µL de chaque mélange de produits PCR marqués sont déposés dans la plaque de dépôt du séquenceur CEQ8800 (Beckman-Coulter) afin d'y ajouter 0.25µL/puits de standard de taille (GenomeLab DNA Size Standard Kit – 400, Beckman-Coulter) et 35.75µL de Sample loading solution (Beckman-Coulter).

Les mélanges PCR sont dénaturés 2 min à 95°C puis injectés électro cinétiquement dans les capillaires (30sec à 4.5kVolts) et séparés dans les capillaires pendant 35min à 6kVolts. Les fluorochromes sont détectés par l'excitation de 2 lasers émettant dans l'infrarouge à 650 et 750 nm respectivement.

Les données brutes ont été traitées à l'aide de CEQ 8800 genetic analyzer and software (Beckman Coulter, Fulerton, CA, USA) en utilisant les paramètres d'étalonnage de mobilité pour chaque Dye et les paramètres par défaut de la taille du standard de taille.

III.2.3 Biologie de la reproduction des hybrides somatiques d'agrumes

De la gamétogenèse à l'obtention de plantules viables en passant par l'apomixie, l'étude des différentes phases du processus de reproduction est essentielle pour comprendre la biologie de la reproduction des hybrides somatiques. Cette étude a porté sur la description des fleurs,

taille, germination et viabilité pollinique, de cinq hybrides somatiques et des différentes parentales.

III.2.3.1 Description des fleurs

Pour chaque génotype, 10 fleurs ont été choisies. Sur ces fleurs, ont été déterminés : le type de fleurs, la couleur externe et interne et la couleur des anthères, le diamètre moyen du calice, la longueur moyenne des pétales et le nombre d'étamines. Les mesures de longueurs et de diamètres ont été réalisées à l'aide d'un pied à coulisse.

III.2.3.2 Evaluation de la germination pollinique

Le test de germination du pollen est réalisé un jour après la récolte du bouton. Le pollen est déposé sur un milieu gélosé, nutritif, qui favorise la germination (200g/l de saccharose, 8g/l d'agar, 25mg/l d'acide borique), puis il est incubé pendant 24 h à température ambiante dans une atmosphère saturée en eau.

Le nombre de grains germés est compté 24 h après le dépôt, à l'aide d'un microscope photonique (objectif 20x). Ce test est répété trois fois et un pourcentage de grains germés est établi. Le pourcentage moyen de germination pour chaque génotype est calculé par une série de 3 comptages de 300 grains de pollen au microscope photonique.

III.2.3.3 Evaluation de la taille et la viabilité pollinique des hybrides somatiques et de leurs parents diploïdes

La viabilité pollinique des hybrides somatiques et de leurs parents est déterminée par différence de coloration entre pollen viable et non viable comme décrit par Alexander (1980). Ainsi, 3 anthères provenant de fleurs différentes sont individuellement hachées dans une goutte de solution de coloration puis mises entre lame et lamelle. Trois observations par lame sont réalisées à l'aide d'un microscope Nikon 80i et un comptage de grains de pollen colorés sur 300 grains est réalisé pour chaque génotype.

La taille des grains de pollen est évaluée au microscope à l'aide du logiciel d'analyse d'image LUCIA version 5.0.

III.2.3.4 Evaluation de l'apomixie et de la fertilité femelle des hybrides somatiques et de leurs parents diploïdes

L'analyse de la fertilité femelle et de l'apomixie a été réalisée sur les différents hybrides somatiques et leurs parents.

Une dizaine de fruits par génotype est récoltée pour l'évaluation de la fécondité. L'extraction de pépins est réalisée et le nombre de pépins relevé pour chaque fruit et pour chaque génotype afin de déterminer un taux de fertilité. Le comptage d'embryons est ensuite réalisé pour chaque génotype sur 45 embryons choisis au hasard sur le lot de fruits de chaque hybride. Ces pépins sont issus des pollinisations libres du printemps 2009.

Les téguments des pépins sont enlevés au scalpel et les embryons sont dénombrés après observation à la loupe binoculaire.

III.2.4 Etude cytogénétique et de la ségrégation allélique chez les hybrides somatiques d'agrumes

III.2.4.1 Etude de la méiose

L'étude cytogénétique a été réalisée sur des boutons floraux prélevés à des stades de développement précoces des bourgeons floraux. (Figure 12). Ces boutons sont d'abord fixés dans une solution d'alcool acétique (1v d'acide acétique et 3v d'éthanol absolu) pendant 24 heures avant d'être stockés à 4°C dans de l'éthanol 70°. Les anthères fixées sont hachées finement sur une lamelle contenant une goutte (15 à 20 µL) de carmin acéto-ferrique (Li, *et al.* 2007). Le hachis est ensuite recouvert avec une lamelle puis uniformément étalé en exerçant des pressions régulières du centre vers l'extérieur. Cette préparation est chauffée pour permettre au colorant de mieux pénétrer dans les cellules. Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope Nikon 80i en lumière directe ou au contraste interférentiel différentiel (DIC) aussi appelé contraste « Nomarski », permettant d'obtenir un effet de relief et ainsi distinguer les liaisons chromosomiques.



Figure 12: Bourgeons floraux de WLM+EUR prélevés pour l'étude cytogénétique de cet hybride somatique

III.2.4.2 Etude de la ségrégation allélique chez les hybrides somatiques

III.2.4.2.1 Modèle de formation des gamètes

En considérant un tétraploïde de génotype ABCD, en ségrégation tétrasomique et en absence de double réduction, les gamètes AB, AC, AD, CD, BD et BC sont produits à proportions égales ($1/6$). Si des tétravalents sont toujours formés au cours de la méiose, la fréquence maximale de double réduction $\alpha = 1 / 6$ peut être atteinte. Sous ce scénario, la production de gamètes de double réduction AA, BB, CC et DD est effective à une proportion de $\alpha/4$ en plus des gamètes AB, AC, AD, CD, BD et BC qui ont alors une proportion égale de $(1/6-\alpha/6)$ (Stift, *et al.* 2008).

Par ailleurs si le tétraploïde ABCD ségrège de manière disomique, un appariement AB/CD est caractérisé : par la formation de bivalents durant la méiose, par la production des gamètes AB, AD, BC et BD à proportions égales ($1/4$) et enfin par l'absence de double réductions. Dans cette situation les allèles A et B, marquant des chromosomes homologues, ne se retrouvent jamais dans le même gamète, tout comme les allèles C et D.

D'autres possibilités d'appariement chromosomique, comme AC/BD et AD/BC sont aussi probables qu'un appariement AB/CD et donneront respectivement les gamètes AB, AD, BC, CD et AB, AC, BD, CD à proportions égales. En résumé, pour un tétraploïde ABCD, les

proportions attendues des gamètes produits peuvent être calculées de la manière suivante (Stift, *et al.* 2008) :

$$p(AA)=\frac{1}{4}\beta\tau$$

$$p(BB)=\frac{1}{4}\beta\tau$$

$$p(CC)=\frac{1}{4}\beta\tau$$

$$p(DD)=\frac{1}{4}\beta\tau$$

$$p(AB)=\frac{1}{6}\tau-\frac{1}{6}\beta\tau+(1-\tau)(\frac{1}{4}\delta_2+\frac{1}{4}\delta_3)$$

$$p(AC)=\frac{1}{6}\tau-\frac{1}{6}\beta\tau+(1-\tau)(\frac{1}{4}\delta_1+\frac{1}{4}\delta_3)$$

$$p(AD)=\frac{1}{6}\tau-\frac{1}{6}\beta\tau+(1-\tau)(\frac{1}{4}\delta_1+\frac{1}{4}\delta_2)$$

$$p(CD)=\frac{1}{6}\tau-\frac{1}{6}\beta\tau+(1-\tau)(\frac{1}{4}\delta_2+\frac{1}{4}\delta_3)$$

$$p(BD)=\frac{1}{6}\tau-\frac{1}{6}\beta\tau+(1-\tau)(\frac{1}{4}\delta_1+\frac{1}{4}\delta_3)$$

$$p(BC)=\frac{1}{6}\tau-\frac{1}{6}\beta\tau+(1-\tau)(\frac{1}{4}\delta_1+\frac{1}{4}\delta_2)$$

Ces équations définissent un lot d'équations non linéaires à quatre inconnues. Le paramètre τ correspond au taux de gamètes formés par appariement chromosomique aléatoire lors de la méiose. τ peut prendre des valeurs allant de 0 (disomie complète) à 1 (tétrasomie complète). En cas de tétrasomie complète ($\tau=1$), la seconde partie des équations devient nulle et les proportions attendues des gamètes ne dépendent plus que de la valeur de β , la fréquence de double réduction relative à la fréquence d'appariement aléatoire lors de la méiose. Ainsi la fréquence de double réduction α peut être calculée : $\alpha = \beta \tau$.

Cependant, si $\tau < 1$, les proportions gamétiques attendues dépendraient des paramètres δ_1 , δ_2 et δ_3 indiquant, respectivement, le degré d'appariement préférentiel AB/CD, AC/BD et AD/BC. Chacun de ces paramètres peut prendre des valeurs allant de 0 (aucun appariement) à 1 (appariement obligatoire) avec $\delta_1 + \delta_2 + \delta_3 = 1$ et $\delta_1 \times \delta_2 \times \delta_3 = 0$.

III.2.4.2.2 Analyse des données observées

Dans un premier temps, un test khi 2 a été réalisé afin de vérifier l'absence de distorsion allélique au niveau de la descendance. Ce test permet alors de vérifier cette hypothèse en utilisant la formule suivante :

$$\chi^2 = \sum_{i,j} \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

O_{ij} et E_{ij} représentent respectivement le nombre d'allèles observés et attendus. L'hypothèse nulle étant absence de distorsion allélique, aucune différence avec l'hypothèse nulle est acceptée à une probabilité $p > 0,05$.

Dans un deuxième temps, afin de déterminer le mode de ségrégation, la distribution multinomiale a été utilisée pour calculer la probabilité L (Olson 1997), correspondant à la probabilité d'observer les différents génotypes dans la descendance, en utilisant la formule suivante :

$$L = \frac{n!}{n_1! n_2! \dots n_k!} \prod_{i=1}^k P X_i^{n_i}$$

n est le nombre d'individus dans la descendance, n_i le nombre d'individus de génotype i et PX_i la fréquence d'apparition attendu du génotype i .

La vraisemblance totale par rapport à l'ensemble des observations est calculée selon la formule :

$$L(data) = \sum_{i=1}^k x_i \ln(p_i)$$

x_i correspond à la fréquence de gamètes AA et p_i à la probabilité attendue (sous un modèle de ségrégation donné) des gamètes AA.

Ensuite, la fonction de régression contrainte non linéaire de SPSS a été utilisée (Stift, *et al.* 2008). Cette fonction permet d'estimer les valeurs des différents paramètres de ségrégation permettant de donner la plus grande vraisemblance $L(\text{data})$ pour les modèles suivants :

Tétrasonie complète ($\tau=1$): où le taux de double réduction $\beta\tau$ est estimé.

Trois modèles intermédiaires avec contraintes : où τ et $\beta\tau$ sont estimés alors que δ_1 , δ_2 et δ_3 sont fixés chacun respectivement à 1.

Trois modèles intermédiaires sans contraintes : où τ , $\beta\tau$ et deux des paramètres disomiques sont estimés alors que le troisième est fixé à 0.

Dans le but de comparer les différents modèles, on calcule, tout d'abord la déviance G (Sokal et Rohlf 1995) pour chaque modèle en suivant la formule:

$$G=2\sum_i OBS_i \ln\left(\frac{OBS_i}{ATT_i}\right)$$

Puis on évalue si un modèle intermédiaire représente le mieux les données observées par rapport à l'hypothèse nulle de ségrégation tétrasomique en utilisant un test de rapport des vraisemblances « LRT » (likelihood ratio test) adapté (Self et Liang 1987). Une comparaison des modèles intermédiaires avec une hypothèse nulle de ségrégation disomique n'est pas informative à cause d'observations de génotypes inattendus.

En cas de locus présentant un allèle nul, ABC0 ou AAB0, on ne peut pas différencier les génotypes AA de A0, BB de B0 et CC de C0. Plusieurs scénarios sont ainsi proposés (distribution linéaire des génotypes) et grâce à un test de distorsion allélique on rejette les scénarios inappropriés à une $p<0,05$. N'ayant aucune justification statistique pour rejeter les scénarios ne présentant aucune distorsion allélique significative, nous avons choisi d'ignorer les individus issus d'une double réduction, ce qui permet de représenter le G en fonction des différentes valeurs de τ . Cette méthode nous permet de contourner cette problématique et donc, pour chaque scénario, de ne pas rejeter ces scénarios en se basant sur les fréquences alléliques. Ainsi on observe les classes gamétiques dont on peut être sûr et les courbes de G en fonction τ pour chacun des scénarios possibles. Le scénario le plus probable étant celui présentant le minimum d'écart avec les résultats observés.

III.2.5 Analyse statistique

Un test de Kruskal-Wallis est réalisé pour chaque hybride somatique vis-à-vis de ses parents diploïdes sur toutes les variables quantitatives phénologiques et polliniques une à une. Il est suivi d'un test à posteriori de Mann-Whitney afin de distinguer les différences entre les trois individus.

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1 ETUDE DE LA TRANSMISSION DES CARACTERES LIES A LA BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ LES HYBRIDES SOMATIQUES D'AGRUMES

IV.1.1 Résumé de l'article

Introduction

Les agrumes représentent la première production fruitière mondiale avec 124 millions de tonnes en 2008 (FAOSTAT, 2010). La production totale des agrumes est en constante augmentation. Les agrumes sont cultivés entre le 40^{ème} parallèle Nord et Sud car cette culture pérenne ne supporte pas le climat froid. La culture des agrumes a une importance économique considérable dans les pays producteurs tels que la Chine, le Brésil, les Etats-Unis et les pays du pourtour méditerranéen. Cependant, l'agrumiculture est confrontée à plusieurs contraintes biotiques et abiotiques ainsi qu'à une demande et des exigences croissantes, en matière de qualité, de la part du consommateur et du marché. Afin de répondre à ces demandes, les programmes d'amélioration et de développement sont nécessaires. Le CIRAD conduit un programme de recherches sur les agrumes. Ce programme vise la diversification du groupe de petits agrumes triploïdes, stériles, possédant des caractères qualitatifs élevés, ainsi que la création de porte-greffe cumulant des tolérances aux stress biotiques et abiotiques. Cependant, ce programme d'amélioration et de développement est confronté à un système de reproduction complexe chez les agrumes qui se caractérise par une grande diversité de comportement (diversité morphologique florale, fertilité mâle et femelle variables, polyembryonie et apomixie).

L'utilisation des hybrides somatiques d'agrumes est devenue une composante importante dans les programmes d'amélioration des agrumes. En effet, ces hybrides somatiques peuvent être utilisés dans des croisements interploïdaux pour la création de triploïdes ou en tant que porte-greffe combinant des traits importants, présents chez deux espèces sexuellement incompatibles. L'étude et la compréhension de la biologie de la reproduction de ces hybrides somatiques sont nécessaires pour pouvoir optimiser leurs utilisations dans les programmes d'amélioration.

Ainsi plusieurs questions de recherches se posent :

Comment se transmettent la morphologie florale et la fertilité mâle et femelle, chez les hybrides somatiques d'agrumes ?

Comment se transmettent l'apomixie et la polyembryonie ?

Existe-t-il des phénomènes de dominance ?

Afin de répondre à ces questions, l'étude phénologique, de la fertilité femelle, de la viabilité et germination polliniques, du taux de polyembryonie et de plants d'origines zygotiques, dans les descendances issues de pollinisation libre de sept hybrides somatiques et de leurs parents ont été réalisées.

Matériels et méthodes

Sept hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes ainsi que leurs parents ont fait l'objet de cette étude :

Mandarinier Willowleaf (*Citrus reticulata* Blanco) "WLM" + Pomelo Star Ruby (*C. paradise* Mactad) "SRG": WLM+SRG

"WLM" + Oranger Shamouti (*C. sinensis*) "SHO": WLM+SHO

"WLM" + Citronnier Eureka (*C. limon* L. Burm) "EUR": WLM+EUR

"WLM" + Poncirus Pomeroy (*Poncirus trifoliata*) "PON": WLM+PON

"SRG" + Cédratier Corse (*C. medica*) "COC": SRG+COC

"SRG" + Limettier mexicain (*C. aurantifolia*) "MEL": SRG+MEL

"MEL" + "SHO": MEL+SHO

Une étude phénologique et pollinique ont été réalisées. La fertilité et la polyembryonie ont été estimées par comptage du nombre moyen de pépins par fruit et du nombre d'embryon par pépins, respectivement. Enfin, l'étude de l'apomixie a été réalisée par l'évaluation du pourcentage de plants zygotiques sur les descendances libres des hybrides et de leurs parents à l'aide de marqueurs SSR en électrophorèse capillaire.

Résultats et discussion

L'ensemble des hybrides ont montré un appareil floral et une fertilité intermédiaires ou identiques à l'un des parents évoquant respectivement, une expression additive ou non additive des génomes parentaux. Cependant, l'apparition de nouveaux phénotypes floraux et

polliniques, chez certains hybrides somatiques, serait due à une expression transgressive des génomes parentaux ou alors aux effets de la polyploïdisation connue pour l'augmentation du volume cellulaire. L'évaluation de la fertilité femelle chez ces hybrides somatiques a montré que celle-ci est soit équivalente ou intermédiaire se rapprochant du parent le plus faible. Par ailleurs, ce caractère dépend de plusieurs facteurs climatiques et physiologiques rendant ainsi l'étude de sa transmission plus complexe.

En revanche, les résultats sur la transmission de l'apomixie et la mono/polyembryonie chez les hybrides somatiques sont très différents. En effet, une diminution du degré de polyembryonie et une augmentation du pourcentage de plants d'origine zygotique ont été observées dans les descendances obtenues chez deux hybrides somatiques WLM+SHO et WLM+SRG en comparaison avec leurs parents diploïdes. Un modèle de transmission de ces deux caractères, basé sur les études phylogéniques réalisées chez les agrumes et des travaux ultérieurs sur l'apomixie et la mono/polyembryonie est proposé. Ce modèle propose un contrôle génétique à régulation basée sur un dosage allélique de ces deux caractères.

Ces résultats pourraient être liés aux différents changements structurels, génétiques ou épigénétiques observées qui accompagnent la polyploïdisation.

Toutefois, d'après ces résultats, WLM+SHO et WLM+SRG pourraient être utilisés en tant que parents femelles dans les croisements de type 2x X 4x pour la création de triploïdes.

IV.1.2 Article

Titre: Transmission of characters linked to the reproductive system in *Citrus* somatic hybrids

Mourad Kamiri, Ikbal Srairi, Patrick Ollitrault et Yann Froelicher

Article à Soumettre à Plant Cell Reports

Mourad Kamiri^{1,2}, Ikbal Srairi², Patrick Ollitrault¹ and Yann Froelicher¹

Transmission of characters linked to the reproductive system in Citrus somatic hybrids

1. Unité de Recherche Multiplication végétative, CIRAD San Giuliano, F-20230 France.

2. Domaines Abbes Kabbage, 325, Avenue Hassan II, Agadir, Morocco.

Corresponding author:

Yann Froelicher

Unité de Recherche Multiplication végétative, CIRAD

F-20230 San Giuliano

France

Tel : +33 495595911

Email: froelicher@cirad.fr

Abstract

Somatic hybridization *via* protoplast fusion became an important part of citrus breeding programs. In fact, it allows combining sexually incompatible citrus, sterile varieties or even hybridization between genera. It could be applied to create tetraploids breeding parents that can be used in interploidal crosses to generate seedless triploids or to combine two complementary diploid for rootstocks improvement.

Citrus breeding programs aimed at diversifying high quality triploid seedless citrus fruits and the creation of rootstocks cumulating tolerances to biotic and abiotic stress. However, these improvement programs and development are confronted to a complex reproductive system in citrus, which is characterized by great diversity of behavior (floral biological diversity, male and female fertility variables, polyembryony and apomixis). Thus, several research questions arise on the transmission the reproductive system in citrus somatic hybrids.

In order to answer to these questions and to optimize utilization of these citrus somatic hybrids in breeding programs, study and evaluation of seven somatic hybrids and them fusion parents reproduction biology (floral description, female and male fertility, polyembryony, zygotic rates) was conducted.. Most of the studied somatic hybrids showed intermediate male and female fertility, flower structure, polyembryony rates and zygotic seedlings percentage. This result supposed an additive expression of genes in studied somatic hybrids. However, two somatic hybrids exhibited lower polyembryony level and higher zygotic seedlings percentage when compared to them fusion parents. According to our results and published data, a possible polyembryony/apomixis controlling model in Citrus, involving two complementary dominant genes for each character is proposed.

Keywords: *Citrus*, reproductive biology, fertility, polyembryony, apomixes.

Introduction

Since the first somatic hybrids obtained between potato and tomato (Melchers, et al. 1978), somatic hybridization has become an important component of breeding programs in various species. Indeed, somatic hybridization can increase gene pools diversity of cultivated species, not only bypassing incompatibility or sexual barriers, but also by combining nuclear genomes (Ollitrault, et al. 2000a). It allows introgression of genes from sexually incompatible or sterile genotypes, extending thereby usable genetic resources (Bravo and Evans 1985; Grosser, et al. 1996). Besides nuclear genomes management, somatic hybridization allows combining nuclei of species and organelles of others, mainly for nucleo cytoplasmic male sterility or for the transfer some cytoplasmic resistance traits (Li, et al. 1993; Pelletier, et al. 1982). Moreover, this technique is particularly valuable for managing diversity within polyploid gene pool.

Polyploidy is known as an eventful evolutionary power in flowering plants (Adams and Wendel 2005; Ramsey and Schemske 2002). Polyploid plants are characterized by genome reorganization and subfunctionalization of duplicated genes (Adams, et al. 2003). In fact, polyploids frequently show new phenotypes nonexistent in diploids (Osborn, et al. 2003). Polyploidy can lead to phenotype variations, caused by gene expression variation, genetic and epigenetic changes and altered regulatory interactions (Adams and Wendel 2005; Osborn, et al. 2003; Ramsey and Schemske 2002; Soltis, et al. 2004).

Somatic hybrids are considered as allopolyploids. Generally, somatic hybrids phenotypes were intermediate or completely different from them parental phenotypes (Du, et al. 2009; Rasmussen and Rasmussen 1995; Yan, et al. 1999). However, the mechanisms responsible for phenotype design in somatic hybrids remain poorly understood.

Polyploids, especially allopolyploids, are a valuable material for use in breeding programs to enhance heterozygosity degree or select desirable traits (Ranney 2000). Somatic hybrids fertility is generally lower than in their parents, preventing their further utilization for genetic studies and breeding programs (Binsfeld, et al. 2001; Pijnacker, et al. 1992). Indeed, the trouble of sterility or poor fertility existed in several somatic combinations (Hu, et al. 2002; Lelivelt and Krens 1992; Prakash, et al. 2009; Sigareva and Earle 1999). The null or low female and male fertility in somatic hybrids could be due to unbalanced parental chromosome distribution during meiosis or genetic incompatibilities between parental genomes (Tu, et al. 2008).

In *Citrus*, since the first created somatic hybrid (Ohgawara, et al. 1985), several tetraploid intergeneric and interspecific somatic hybrids have emerged, aiming to combine the beneficial

agronomic traits of both parents for cultivars and rootstocks improvement (Grosser, et al. 2000; Guo and Deng 2001). Indeed, somatic hybridization generated key allotetraploid parents for use in interploid crosses for seedless triploid creation (Grosser, et al. 1996; Ollitrault, et al. 2008). These allotetraploid somatic hybrids don't have a great potential to be used as scions because most of them are seedy. If they are fertile, they could be crosses with diploids for seedless triploid cultivars generation or allow combination of interesting traits issued from sexually incompatible genera (Bassene, et al. 2009b; Ollitrault, et al. 2007).

Transmission of characters such as aromatic compounds or fruit quality traits varied depending on the parental combination (Bassene, et al. 2009a; Gancel, et al. 2003; Gancel, et al. 2005a; Gancel, et al. 2005b). In an allotetraploid *Citrus* somatic hybrid between mandarin (*C. reticulata*) and lemon (*C. limon*), strong dominance of lemon was observed for acid compounds, dominance of mandarin for fructose and the majority of aromatic compounds (Bassene, et al. 2009a). Moreover, pulp transcriptome analysis gave evidence for a non additive inheritance of gene expression in this somatic hybrid (Bassene, et al. 2009b). Other traits are very important for using *Citrus* somatic hybrids in breeding programs.

Citrus are characterized by the complexity of their reproductive system. Self-incompatibility, sterility, facultative apomixis are important traits present in different citrus species that must be considered in breeding programs. Thus, *Citrus* allotetraploid somatic hybrids fertility is of paramount importance in triploid breeding programs. In fact, *Citrus* somatic hybrids could be used as male parent in 2x X 4x sexual crosses (Chandler, et al. 2000; Ollitrault, et al. 2008; Tusa, et al. 1996) or as seed parent if monoembryonic (Aleza, et al. 2009). Usually, *Citrus* somatic hybrids are less fertile than their parents (Chen, et al. 2004). Concerning male fertility, good levels, under diploids one, have been found in several *Citrus* allotetraploid somatic hybrids (Deng, et al. 1995). This can represent a major barrier at their use in breeding programs (Pijnacker, et al. 1992).

In citrus rootstock improvement, it allowed the development of breeding programs at the tetraploid level, maximizing by this way the genetic diversity even at the intergeneric level (Grosser 1990; Grosser and Chandler 2000; Grosser, et al. 1998; Grosser, et al. 1998; Ollitrault, et al. 1998). When used as rootstocks, somatic hybrids seed number and polyembryony rates are considerable characters because will affect them effectiveness spread. In fact, during polyembryonic seed formation, several non zygotic, nucellar embryos, are initiated from nucellar cells surrounding the embryo sac holding the zygotic embryo (Koltunow, et al. 1996). However, the possible presence of zygotic embryo generates a risk of genetic heterogeneity in rootstocks propagation. In fact, this ability to confine a new

individual (identical to the seed parent by apomixis) is one of the most important traits to be considered in *Citrus* rootstock breeding programs (García, et al. 1999).

In order to assess transmission of the characters involved in reproduction of *Citrus* somatic hybrids, seven allotetraploid somatic hybrids obtained during CIRAD *Citrus* breeding program were studied. Polyembryony and apomixis evaluation, as well as evaluating the size, germination and pollen viability and flower structure were realized for each somatic hybrid. These results were then compared to those of its diploid parents. The aim of this study was to analyze the transmission of reproduction characteristics (fertility, apomixis and polyembryony) in *Citrus* somatic hybrids. This is the first study realized for this aspect on somatic hybrids. This knowledge is of a great significance to help and improve *Citrus* breeding programs.

Materials and methods

Plant materials

Seven tetraploid somatic hybrids ($2n = 4x = 36$) (Bassene, et al. 2009b; Gancel, et al. 2003; Gancel, et al. 2005a) had been previously obtained by protoplast fusion between seven diploids ($2n=2x=18$) citrus cultivars (Table 1) (Ollitrault, et al. 2000b). All of these somatic hybrids, as well as their diploid fusion parents, were kept in the open field at the San Giuliano Research Station (Corsica, France), randomly on the same plot and grafted on the same rootstock, *C. volkameriana*.

Flower description

The flowering date was established on observation of tree trees of each species. Ten flowers were randomly selected from each species in order to compare their floral morphology. For each of the studied genotypes, flowers diameter and petal length were measured by a digital calliper. Moreover, petal and stamen number, color and finally the rate of hermaphrodite flowers were annotated.

Pollen size and fertility

Fresh anthers of the somatic hybrid and its parents were squashed and stained following Alexander's method (Palma-Silva, et al. 2004). Stainability rate was determined using 300 pollen grains per anther (3 flowers and 3 anthers from each flower were analyzed). Pollen

stainability was indicative for pollen viability. Diameters of stained and non stained pollen grains were measured under a Nikon Eclipse 80i microscope using LUCIA software version 5.0.

Pollen germination was measured using solid germination medium (0.8% agar, 0.25% boric acid and 200 G/L sucrose). Pollen of flower buds was spread and cultured in dark at room temperature. Three replicates were used for each sample and the germination rate was calculated on the basis of 300 pollen grains. Experiments were repeated 3 times.

Female fertility and seed polyembryony

Fertility was evaluated by seed count in 10 fruits and polyembryony rate by embryo count in 45 randomly selected seeds, under binocular, for each somatic hybrid and its diploid parents.

Somatic hybrids apomixis evaluation

In order to evaluate zygotic embryo rates, a progeny of 60 individuals issued from open pollination of all somatic hybrids and parents was generated. Seedlings were performed at the San Giuliano Research Station (Corsica, France).

Progenies ploidy evaluation

Ploidy level, of each individual, was determined by flow cytometry. Approximately 0.5 cm² of plantlet leave was chopped with a 0.5 cm² of *C. madurensis* (2x) as control in a 250 µl of a nuclei extraction buffer (Partec Cystain UV PreciseP). The solution obtained was filtered (pore size of 30 µm) to eliminate cell debris. After filtration, 800 µl of staining buffer (Partec, Cystain UV Precise P Staining Buffer) was added for DNA staining. The sample was analysed with UV excitation in a Partec flow cytometer (PA-I; Partec, Munster, Germany).

Identification of zygotic plantlets in seedlings

To distinguish zygotics from nucellar seedlings, DNA was extracted from leaves using a modified mixed alkyl trimethyl ammonium bromide (MATAB) procedure (Gawel and Jarret 1991). The concentration of DNA was determined using Hoechst 33258 (Sigma Chemical Co.) protocol (Sambrook and Russell 2006). Samples were diluted with MQ sterile Water and stored at -20°C until use.

Identification of zygotics was realized using seven polymorphic SSR markers (Table 2).

PCR reactions were realized in 20 µl with 1x Taq buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,8U Taq DNA polymerase, 10 ng template DNA, 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM forward primer and 0,4 µM

reverse primer. Amplifications were performed, in MWG AG Primus 96 plus thermocycler, by 40 PCR cycles (94°C for 5 min, 94°C for 30s, primer temperature for 1min, 72°C for 45s then 72°C for 4 minutes). Capillary electrophoresis fluorescence based SSR analyses were conducted on CEQ 8800 (Beckman coulter, Fullerton, CA, USA) following Beckman coulter protocol: <http://www.beckmancoulter.com/literature/Bioresearch/608113-AK.pdf>. Forward primers were 5' labeled with WellRED Fluorescent dye (PAdye2, PAdye3 or PAdye4) (Sigma Aldrich).

Raw data were processed using the CEQ 8800 genetic analyzer and software (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) using calibration mobility parameters for each dye and defaults parameters of standard size. The use of SSR markers coupled with capillary electrophoresis helped to assess the genetic origin of plant. This analysis was made possible by the possibility to estimate the copy number per allele (Landerogott, et al. 2006) using MAC-PR (Esselink, et al. 2004). Indeed the height of peaks was strictly correlated to the allele dose and double-dose or triple-dose effects were clearly observed on the chromatograms, compared to the single alleles/peaks.

Statistical analysis

A Kruskal-Wallis test is realized for each somatic hybrid and its diploid parents on all quantitative variables, pollen and flowers characters one to one. It is followed by an a posteriori Mann-Whitney test to distinguish the differences between the different genotypes.

Results

Flower description

Citrus genotypes flowering period was situated between late April and late May while *Poncirus* flowering period was ranged between late February and late March. Citrus interspecific somatic hybrids flowering time was not different from that of *Citrus*. However, WLM+PON flowering period was intermediate to *Citrus* and *Poncirus* flowering period close to *Citrus* (Table 3).

Flower structure evaluation showed significant differences between fusion parent's flowers. Observations are summarized in Table 3. As parent of four of the seven studied somatic hybrids, WLM presented a small floral device when compared to the other parents. Indeed, WLM calyx diameter (4.87 mm) is reduced compared to EUR (7.06 mm) and SRG (7.33

mm). COC and SHO showed the larger calyx diameter (10.6 and 6.62 mm respectively). PON flowers had the smallest calyx diameter (1.7 mm) while they owned the longest petals (31.26 mm) while MEL flowers owned the shorter (9.5 mm). These latter's owned the least number of petals while WLM has the most. In terms of stamens number, WLM flowers owned the least (13.1) the opposite of EUR flowers who had the most. All parental flowers were white except EUR and MEL flowers that had anthocyanin color.

Significant differences have been observed between somatic hybrids and them diploid parents flowers. WLM+PON flowers were twice as large as WLM flowers and 5 times as PON flowers. Petals length was intermediate to parents while they showed the same number of petals and stamens as PON.

SRG+COC exhibited intermediate flowers in term of size, color, and number of stamens. However, petals were larger but equal in number to SRG and the number of male flowers increased.

SRG+MEL was also different from SRG and MEL with higher flower diameter and stamens number. Yet, petals number and length and hermaphrodite flowers number were intermediate while the number of petals and them color were identical to MEL.

WLM+EUR and WLM+SRG showed flowers very close, respectively, to EUR and SRG in diameter, length and number of petals and color. The number of stamens and the number of male flowers in WLM + EUR were intermediate to fusion parents. However, WLM+SHO exhibited characteristics not significantly different from SHO.

Finally, MEL+SHO exhibited intermediate flowers in term of diameter. Tough, these flowers had higher petals length and number of stamens.

Pollen fertility

Pollen stainability, germinability and size were highly variable between diploid parents (Table 4). Indeed, WLM had high pollen stainability (96%) and *in vitro* germination rate (96%) while SRG (31% and 4%, respectively) and EUR (20% and 5%, respectively) owned the lowers. Pollen stainability and germinability in WLM+SRG, WLM+EUR and SRG+COC was intermediate to them fusion parents. However, WLM+PON and WLM+SHO showed lower stainability and germination rates compared with their diploid parents. SRG+MEL was the only somatic hybrid with higher stainability and lower germination rates regarding its parents. Somatic hybrids pollen size was higher in 5 of the 7 studied somatic hybrids compared with fusion parents, while no significant size difference was observed between WLM+EUR and EUR and MEL+SHO and SHO. Besides, micropollen rates in studied

somatic hybrids were significantly higher than those in their diploid parents except in MEL+SHO and WLM+PON somatic hybrids.

Female fertility and seed polyembryony

Diploids female fertility was highly variable, ranging from 0.9 seed per fruit in SHO to 148 in COC. SRG+COC and WLM+PON showed intermediate seed number between them fusion parents. WLM+SRG, WLM+SHO, SRG+MEL and WLM+EUR showed no significant difference in seed number as SRG, SHO, SRG and WLM respectively (Table 5).

WLM and COC were the diploid parents with extreme number of embryos per seed. In fact, COC was the only parent fully monoembryonic while WLM was the parent where the number of embryos per seed was greater. In WLM+SRG, WLM+SHO and SRG+MEL, this parameter values were significantly lower than in diploids parents. SRG+COC was almost monoembryonic. WLM+PON and WLM showed no significant difference for the number of embryos while it was intermediate between fusion parents in WLM+EUR (Table 5).

Somatic hybrids apomixis evaluation

Nucellar and zygotic plantlets were identified by ploidy evaluation and SSR analyzes. Diploid parent's seedlings were all diploid while somatic hybrids seedlings showed different ploidy levels (**Table 6**). In fact, WLM+SRG, WLM+SHO and SRG+MEL showed 10%, 6% and 1% triploid plantlets respectively. Moreover, unlike the other somatic hybrids, WLM+SHO and WLM+SRG had 6x offspring. This last was also the only somatic hybrid holding a diploid plantlet among his progeny. Nevertheless, SRG+COC, WLM+EUR and WLM+PON seedlings were completely tetraploids. However, MEL+SHO somatic hybrid has not born fruit this year.

The use of SSR markers coupled with capillary electrophoresis helped to asses the genetic origin of these ploidy variations (Table 6). Electrophoretic profiles showed that obtained triploids were issued from allofecondation of diploid female gamete by diploid's pollen. Obtained hexaploids showed the same profile as triploids suggesting triploids chromosome doubling as responsible for them formation. Finally, the diploid, obtained in WLM+SRG seedlings, would be issued from an allofecondation of a haploid viable female gamete (Figure 1 and 2).

Thus, COC was the parent with the highest percentage of zygotics while SRG showed the lowest. In somatic hybrids, this percentage was intermediate between diploid parents in WLM+PON, SRG+MEL and SRG+COC. However, WLM+SRG and WLM+SHO showed 70

and 71 % of zygotics, respectively, highly above their fusion parents. Howsoever, WLM+EUR seedlings were entirely nucellar.

Discussion

Each studied citrus somatic hybrid exhibited particular flower characteristics. Indeed, the majority of these characteristics were intermediate between fusion parents with, sometimes, dominance of one of both parents. This was described in several citrus somatic hybrids (Kobayashi, et al. 1995). Thus, somatic hybrids involving SRG showed flowers closer to the latter while those involving WLM showed flower closest to the second parent.

Somatic hybrids may express intermediate phenotypes to both parents but also new phenotypes, suggesting, respectively, additive and non-additive gene expression (Chen 2007; Pumphrey, et al. 2009; Wang, et al. 2005). In fact, some characters displayed by these somatic hybrids evoke an additive expression of genes, such as the number of stamens in WLM + SRG and SRG + COC. However, other characters suggest a transgressive expression, such as flower diameter in WLM+PON and SRG+MEL or petals length in MEL+SHOO and WLM+SHO. These changes in floral structure could be also issued from polyploidization effects leading to cell volume increase (Cavalier-Smith 1978) and by this way giving birth to vegetative and reproductive organs larger than diploid parents (Otto and Whitton 2000).

Concerning studied pollen, all somatic hybrids showed intermediate values, approaching the parent with the lowest value, or lower stainability and germination, compared to their fusion parents. Moreover, micropollen pourcentages in the majority of studied somatic hybrids were higher than parents. Pollinic behavior of these somatic hybrids was analyzed for further utilization as male parents in 2x X 4x crosses for triploid citrus creation (Grosser, et al. 2000). Low germinations and stainability rates were consistent with observations made in several *Citrus* somatic hybrids (Grosser, et al. 2000; Ollitrault, et al. 2008). Indeed, Chen et al. (2004) observed multivalents and univalents during meiosis in two *Citrus* somatic hybrids between Hamlin Orange+Rough Lemon and Key Lime+Valencia Orange. Multivalents formation prevent normal chromosome pairing leading to pollen with intermediate germination (Chen, et al. 2004). Furthermore, univalents frequency is negatively correlated to pollen fertility in *Citrus* (Del Bosco, et al. 1999) and positively to micropollen formation (Chen, et al. 2004). The wide sexual compatibility between *Citrus* species could be responsible for this low male fertility. These results were in agreement with recent studies of inheritance mode in citrus somatic hybrids. In fact, inheritance, at the interspecific and intergeneric level, was neither

disomic nor tetrasomic but intermediate, revealing genomic homology between fusion parents (Kamiri, et al. Submitted). Nevertheless, low fertility of some fusion parents may explain observed somatic hybrids fertilities. Despite a lower male fertility, most citrus somatic hybrids are fertile. In contrast, fertility is much more lower or even null in different somatic hybrids of higher plants (Harms 1983; Pijnacker, et al. 1992).

Somatic hybrids female fertility assessment showed that it was either equivalent or intermediate approaching the lowest diploid parent, except for WLM+EUR. Dominance of SRG was observed at this level in SRG+MEL and WLM+SRG while dominance of WLM was observed in WLM+EUR and WLM+PON. Garcia et al. (2000) identified two genomic regions containing QTLs operating seed number per fruit and the number of fruits in *C. volkameriana*. Besides, fruit size is showed to be an associated trait to seed and fruit number (García, et al. 2000). Thus, several external and physiologic factors as temperature, parthenocarpy, or fruit abscission could influence seed number (Spiegel-Roy and Goldschmidt 1996) and then female fertility.

Polyembryony was variable depending on the studied somatic combinations. In WLM+EUR and WLM+PON, polyembryony degree was intermediate between fusion parents close to WLM. However, polyembryony degree in WLM+SRG, WLM+SHO, SRG+MEL decreased up while fusion parents are highly polyembryonic. SRG+COC showed the lowest degree of polyembryony in somatic hybrids as its diploid parent COC, the only strictly monoembryonic. The rate of zygotic plantlets in our somatic hybrids and them parent's seedlings was also variable depending the combination. Indeed, the rate of zygotic plantlets in WLM+EUR, WLM+PON, SRG+COC and SRG+MEL was intermediate between them diploid parents. However, it was strongly higher in WLM+SRG and WLM+SHO (70% and 71% respectively) than in WLM, SRG and SHO (7%, 2% and 5% respectively). Generally, zygotic were generated at a high frequency from monoembryonic seeds produced by parents or somatic hybrids with a low polyembryony degree. A correlation was observed between the percentages of zygotics and monoembryonic seeds suggesting existence of a relationship between polyembryony and nucellar embryony. These results are in agreement with previous results of Garcia et al (1999), assuming that these traits were related since, polyembryonic cultivars are apomictic and that reverse is not true. Nevertheless, a differential expression of apomixis and polyembryony in our somatic hybrids has been observed. These phenotype modifications could be due to polyploidization. In fact, polyploids often show phenotypes not present or beyond that of their parents (Levin 1983; Ramsey and Schemske 2002).

Theories of apomixis inheritance have evolved over time. Indeed, many genetic models for apomixis/mono-polyembryony inheritance have been previously proposed. Parlevliet and Cameron (1959) suggested that this character is controlled by a major dominant gene *P* and minor or modifier genes influencing its expression. This model have been revised by Cameron and Soost (1979) suggesting a model with two dominant genes *P1p1 P2p2*. Hong et al (2001) proposed that nucellar embryony in *Citrus* x *Poncirus* involve two complementary genes, *A1* and *A2* that must be present at the dominant state to produce apomictic seeds.

Our results followed this last model, supposing two complementary genes controlling these two characters, *A* and *B* controlling apomixis and *C* and *D* controlling mono/polyembryony.

We suggest that diploid genotypes *A_B_* give rise seeds trough apomixis and genotypes *C_D_* are polyembryonic.

Using phylogenetic relationships between most of the used species (Nicolosi, et al. 2000), we were able to propose a genetic model for apomixis and mono/polyembryony transmission. We have deduced that WLM, SRG, and SHO could be genotyped *AaBB*; MEL, EUR and PON could be all genotyped *AaBb* while COC might be genotyped *aaBb*. We have suggested that genotypes *A_BB* are highly apomictic compared to *A_Bb* in diploids. Somatic hybrids, WLM+SRG and WLM+SHO were then genotyped *AAaaBBBB*; SRG+MEL, WLM+EUR and WLM+PON were genotyped *AAaaBBBb* and SRG+COC *AaaaBBBb*.

For polyembryony, WLM, SRG, MEL and SHO could be genotyped *CcDD* while COC, EUR and PON could be *ccDd*, *CcDd* and *CcDd* respectively. Somatic hybrids, WLM+SRG, WLM+SHO and SRG+MEL were then genotyped *CCccDDDD*, WLM+EUR and WLM+PON genotyped *CCccDDDDd* and finally SRG+COC *CcccDDDDd*.

When compared to their diploid parents, all studied somatic hybrids were apomictic and polyembryonic. However, significantl raise of zygotic percentages in WLM+SRG and WLM+SHO were observed compared to their diploid parents. Moreover, polyembryony rates in three somatic hybrids WLM+SRG, WLM+SHO and SRG+MEL decreased significantly. Using the previous described genetic model, we suggest that in somatic hybrids, high dose of alleles *B* and *D* are responsible for “feedback effect” on apomixis and polyembryony expression respectively, in our somatic hybrids. Indeed, once allele *B* showed double dose, or more, compared to *A*, zygotic rates in somatic hybrids increased significantly. The same observations were made for alleles *C* and *D* concerning polyembryony.

This model remains questionable, till polyploidy is known to increase variations in expression levels of genes having allele dosage effects (Osborn, et al. 2003). Furthermore, regulatory gene expression networks could be altered by polyploidization (Osborn, et al. 2003). This

could lead to an expansion of the range of phenotypes by giving birth to intermediate or even transgressive ones (Paterson 2005).

Whether apomixis is under genetic control, our results are not sufficient to establish a complete model of apomixis control. In fact, genetic control of apomixis has been previously questioned and supposed to imply epigenetic control (Carman 1997). Moreover, it has been suggested that this epigenetic control is related to polyploidy (Koltunow and Grossniklaus 2003; Roche, et al. 2001). Thus, polyploidization could be responsible for epigenetic changes as observed for *Arabidopsis* and *Brassica* allopolyploids (Chen and Pikaard 1997; Madlung, et al. 2002; Song, et al. 1995).

To summarize, studied somatic hybrids, generally, showed intermediate pollen characteristics to their fusion parents, while they showed an identical female fertility as one of their diploid parents. Polyembryony and apomixis transmissions in somatic hybrids were complex. The raise of zygote level in some somatic hybrids could be potentially advantageous for Citrus breeding programs. Indeed, in addition to the use of these somatic hybrids as male parents in interploidal crosses, for triploid creation, WLM+SRG and WLM+SHO, having potentially interesting genetic background, can be used as female parents. These types of sexual crosses are known to be more productive of triploids. Next step will consist on analyzing the effect of ploidy on apomixis/polyembryony in autetraploid seeds.

References

1. Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF (2003) Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *PNAS* 100:4649-4654
2. Adams KL, Wendel JF (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8:135-141
3. Aleza P, Juárez J, Ollitrault P, Navarro L (2009) Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. *Plant cell reports* 28:1837-1846
4. Bassene JB, Berti L, Costantino G, Carcouet E, Kamiri M, Tomi F, Dambier D, Ollitrault P, Froelicher Y (2009a) Inheritance of characters involved in fruit quality in a citrus interspecific allotetraploid somatic hybrid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:5065-5070
5. Bassene JB, Froelicher Y, Dhuique-Mayer C, Mouhaya W, Ferrer RM, Ancillo G, Morillon R, Navarro L, Ollitrault P (2009b) Non-additive phenotypic and transcriptomic inheritance in a citrus allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* and *C. limon*: the case of pulp carotenoid biosynthesis pathway. *Plant Cell Reports* 28:1689-1697
6. Binsfeld PC, Wingender R, Schnabl H (2001) Cytogenetic analysis of interspecific sunflower hybrids and molecular evaluation of their progeny. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 102:1280-1285
7. Bravo JE, Evans DA (1985) Protoplast fusion for crop improvement. *Plant Breeding Reviews* 3:193-218
8. Cameron JW, Soost RK (1979) Sexual and nucellar embryony in F1 hybrids and advanced crosses of Citrus with Poncirus. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 104:408-410
9. Carman JG (1997) Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61:51-94
10. Cavalier-Smith T (1978) Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *Journal of Cell Science* 34:247-278
11. Chandler JL, Vilorio Z, Grosser JW (2000) Acid citrus fruit cultivar improvement via interploid hybridization. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 113:124-126

12. Chen CL, Guo WW, Yi HL, Deng XX (2004) Cytogenetic analysis of two interspecific *Citrus* allotetraploid somatic hybrids and their diploid fusion parents. *Plant Breeding* 123:332-337
13. Chen ZJ (2007) Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology* 58:377-406
14. Chen ZJ, Pikaard CS (1997) Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes & Development* 11:2124-2136
15. Del Bosco SF, Tusa N, Conicella C (1999) Microsporogenesis in a *Citrus* interspecific tetraploid somatic hybrid and its fusion parents. *Heredity* 83:373-377
16. Deng X, Gmitter FG, Jr., Grosser JW (1995) Pollen fertility of auto- and allo-tetraploids of citrus. *Acta Agriculturae Sinica* 138-143
17. Du X, Ge X, Yao X, Zhao Z, Li Z (2009) Production and cytogenetic characterization of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Isatis indigotica* and backcross progenies. *Plant Cell Reports* 28:1105-1113
18. Esselink GD, Nybom H, Vosman B (2004) Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting-peak ratios) method. *Theoretical and Applied Genetics* 109:402-408
19. Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM (2003) Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. *J Agric Food Chem* 51:6006-6013
20. Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM (2003) Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:6006-6013
21. Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM (2005a) Leaf volatile compounds of six *citrus* somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange, and grapefruit. *J Agric Food Chem* 53:2224-2230
22. Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM (2005b) Citrus somatic allotetraploid hybrids exhibit a differential reduction of leaf sesquiterpenoid biosynthesis compared with their parents. *Flavour and Fragrance Journal* 20:626-632

23. García MR, Asins MJ, Carbonell EA (2000) QTL analysis of yield and seed number in Citrus. TAG Theoretical and Applied Genetics 101:487-493
24. García R, Asins MJ, Forner J, Carbonell EA (1999) Genetic analysis of apomixis in Citrus and Poncirus by molecular markers. TAG Theoretical and Applied Genetics 99:511-518
25. Gawel NJ, Jarret RL (1991) A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. Plant Mol Biol 9:374-380
26. Grosser JW (1990) Citrus rootstock improvement by cell fusion. Citrus and Vegetable Magazine 9:28-32
27. Grosser JW, Chandler JL (2000) Somatic hybridization of high yield, cold-hardy and disease resistant parents for *citrus* rootstock improvement. J Hort Sci Biotechnol 75:641 - 644
28. Grosser JW, Gmitter FG, Jr., Castle WS, Chandler JL (1998) Somatic hybridization: a new approach to citrus rootstock improvement. Fruits (Paris) 53:331-334
29. Grosser JW, Jiang J, Louzada ES, Chandler JL, Gmitter FG (1998) Somatic hybridization, an integral component of citrus cultivar improvement: II. Rootstock improvement. Hortscience 33:1060-1061
30. Grosser JW, Mourao-Fo FAA, Gmitter FG, Louzada ES, Jiang J, Baergen K, Quiros A, Cabasson C, Schell JL, Chandler JL (1996) Allotetraploid hybrids between citrus and seven related genera produced by somatic hybridization. TAG Theoretical and Applied Genetics 92:577-582
31. Grosser JW, Ollitrault P, Olivares-Fuster O (2000) Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 36:434-439
32. Guo WW, Deng XX (2001) Wide somatic hybrids of Citrus with its related genera and their potential in genetic improvement. Euphytica 118:
33. Harms CT (1983) Somatic incompatibility in the higher plant hybrids. Quart Rev Bio 58:
34. Hong QB, Xiang SQ, Chen KL, Chen LG (2001) Two complementary dominant genes controlling apomixis in genus Citrus and poncirus. Yi chuan xue bao= Acta genetica Sinica 28:1062-1067
35. Hu Q, Hansen L, Laursen J, Dixelius C, Andersen S (2002) Intergeneric hybrids between Brassica napus and Orychophragmus violaceus containing traits of agronomic

- importance for oilseed rape breeding. TAG Theoretical and Applied Genetics 105:834-840
36. Kamiri M, Stift M, Srairi I, Costantino G, El Moussadik A, Hmyene A, Bakry F, Ollitrault P, Froelicher Y (Submitted) Evidence for non-disomic inheritance in a *Citrus* interspecific tetraploid somatic between *C. reticulata* and *C. lemon* hybrid using SSR markers and cytogenetic analysis. Plant Cell Reports
 37. Kobayashi S, Ohgawara T, Saito W, Nakamura Y, Shimizu J (1995) Fruit Characteristics and Pollen Fertility of Citrus Somatic Hybrids. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 64:283-289
 38. Koltunow AM, Grossniklaus U (2003) Apomixis: A Developmental Perspective. Annual Review of Plant Biology 54:547-574
 39. Koltunow AM, Hidaka T, Robinson SP (1996) Polyembryony in Citrus (Accumulation of Seed Storage Proteins in Seeds and in Embryos Cultured in Vitro). Plant physiology 110:599
 40. Landergott U, Naciri Y, Schneller JJ, Holderegger R (2006) Allelic configuration and polysomic inheritance of highly variable microsatellites in tetraploid gynodioecious *Thymus praecox* agg. TAG Theoretical and Applied Genetics 113:453-465
 41. Lelivelt CLC, Krens FA (1992) Transfer of resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) into the Brassica napus L. gene pool through intergeneric somatic hybridization with Raphanus sativus L. TAG Theoretical and Applied Genetics 83:887-894
 42. Levin DA (1983) Polyploidy and Novelty in Flowering Plants. Am Nat 122:1
 43. Li YG, Tanner GJ, Delves AC, Larkin PJ (1993) Asymmetric Somatic Hybrid Plants between Medicago-Sativa L (Alfalfa, Lucerne) and Onobrychis-Viciifolia Scop (Sainfoin). Theoretical and Applied Genetics 87:455-463
 44. Madlung A, Masuelli RW, Watson B, Reynolds SH, Davison J, Comai L (2002) Remodeling of DNA Methylation and Phenotypic and Transcriptional Changes in Synthetic Arabidopsis Allotetraploids. Plant Physiol 129:733-746
 45. Melchers G, Sacristán M, Holder A (1978) Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. Carlsberg Research Communications 43:203-218
 46. Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, Malfa SI, Continella G, Tribulato E (2000) *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. TAG Theoretical and Applied Genetics 100:1155-1166

47. Ohgawara T, Kobayashi S, Ohgawara E, Uchimiya H, Ishii S (1985) Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. Theoretical and Applied Genetics 71:
48. Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Bakry F, Aubert B (1998) Rootstock breeding strategies for the Mediterranean citrus industry; the somatic hybridization potential. Fruits (Paris) 53:335-344
49. Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Carreel F, D'Hont A, Luro F, Bruyère S, Cabasson C, Lotfy S, Joumaa A (2000a) Apport de l'hybridation somatique pour l'exploitation des ressources génétiques des agrumes. Cahiers Agricultures 9:223-236
50. Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Carreel F, D'Hont A, Luro F, Bruyere S, Cabasson C, Lotfy S, Joumaa A, Vanel F, Maddi F, Treanton K, Grisoni M (2000b) Somatic hybridisation potential for *Citrus* germplasm utilization. Cahiers Agricultures 9:223-236
51. Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Froelicher Y (2008) Ploidy manipulation for breeding seedless triploid *citrus*. Plant Breeding Reviews 30:323-352
52. Ollitrault P, Guo WW, Grosser JW (2007) Somatic hybridization. In Citrus genetics, breeding and biotechnology 235-260
53. Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Martienssen RA (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. Trends in Genetics 19:141-147
54. Otto SP, Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. Annu Rev Genet 34:401-437
55. Palma-Silva C, dos Santos DG, Kaltchuk-Santos E, Bodanese-Zanettini MH (2004) Chromosome numbers, meiotic behavior, and pollen viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. Journal of Botany 91:804-807
56. Parlevliet JE, Cameron JW (1959) Evidence on the inheritance of nucellar embryony in citrus. In, pp 252-260
57. Paterson A (2005) Polyploidy, evolutionary opportunity, and crop adaptation. Genetica 123:191-196
58. Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrit P, Remy R, Rousselle, Renard M (1982) Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. Molecular & General Genetics 191:244-250

59. Pijnacker LP, Ferwerda MA, Mattheij WM (1992) Microsporogenesis in three tetraploid somatic hybrids of potato and their di(ha)ploid fusion partners. TAG Theoretical and Applied Genetics 85:269-273
60. Prakash S, Bhat SR, Quiros CF, Kirti PB, Chopra VL (2009) Brassica and its close allies: cytogenetics and evolution. Plant Breeding Reviews 31:21-187
61. Pumphrey MO, Bai J, Laudencia-Chingcuanco D, Anderson O, Gill BS (2009) Non-Additive Expression of Homoeologous Genes is Established Upon Polyploidization in Hexaploid Wheat. BioEssays genetics.108.096941
62. Ramsey J, Schemske D (2002) Neopolyploidy in flowering plants. Annual Review of Ecology and Systematics 33:589-639
63. Ranney TG (2000) Polyploidy: From Evolution to Landscape Plant Improvement Proceedings of the 11th Metropolitan Tree Improvement Alliance (METRIA) Conference held in Gresham, Oregon
64. Rasmussen JO, Rasmussen OS (1995) Characterization of somatic hybrids of potato by use of RAPD markers and isozyme analysis. Physiologia Plantarum 93:357-364
65. Roche D, Hanna WW, Ozias-Akins P (2001) Is supernumerary chromatin involved in gametophytic apomixis of polyploid plants? Sexual Plant Reproduction 13:343-349
66. Sambrook J, Russell DW (2006) Fluorometric Quantitation of DNA Using Hoechst 33258. Analytical biochemistry 2006:pdb.prot4458-
67. Sigareva MA, Earle ED (1999) Regeneration of plants from protoplasts of *Capsella bursa-pastoris* and somatic hybridization with rapid cycling *Brassica oleracea*. Plant Cell Reports 18:412-417
68. Soltis DE, Soltis PS, Tate JA (2004) Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. New Phytologist 161:173-191
69. Song K, Lu P, Tang K, Osborn TC (1995) Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92:7719-7723
70. Spiegel-Roy P, Goldschmidt EE (1996) Biology of citrus. Cambridge Univ Pr
71. Tu Y, Sun J, Liu Y, Ge X, Zhao Z, Yao X, Li Z (2008) Production and characterization of intertribal somatic hybrids of *Raphanus sativus* and *Brassica rapa* with dye and medicinal plant *Isatis indigotica*. Plant cell reports 27:873-883
72. Tusa N, Fatta Del Bosco S, Nardi L, Lucretti S (1996) Obtaining triploid plants by crossing Citrus limon cv 'Feminello' $2n \times 4n$ Allotetraploid somatic hybrids. VIII Int Cong Citriculture, Int Soc Citr, South Africa 1:133-136

73. Wang J, Tian L, Lee H-S, Wei N, Jiang H, Watson B, Madlung A, Osborn T, Doerge RD, Comai L, Chen ZJ (2005) Genome-wide Non-additive Gene Regulation in Arabidopsis Allotetraploids. *Genetics* genetics.105.047894
74. Yan Z, Tian Z, Huang R, Huang B, Meng J (1999) Production of somatic hybrids between Brassica oleracea and the C3–C4 intermediate species Moricandia nitens. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 99:1281-1286

Figure captions:

Figure 1 : Electropherograms of mCrCIR07D06 loci and PCR based dosage effects of allele copy number in WLM, SRG, WLM+SRG, 6x, 3x and 2x hybrids issued from open pollination of WLM+SRG somatic hybrid

Figure 2 : Electropherograms of mCrCIR02D11 loci and PCR based dosage effects of allele copy number in WLM, SHO, WLM+SHO, 6x and 3x Hybrids issued from open pollination of WLM+SHO somatic hybrid

Table 1: Studied tetraploid citrus somatic hybrids and them diploid fusion parents

| Fusion parent 1 | Fusion parent 2 | Somatic hybrid |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------|
| Willowleaf mandarin (<i>C. reticulata</i> Blanco) "WLM" 2n=2x=18 | Pomeroy poncirus (<i>P. trifoliata</i> L) "PON" 2n=2x=18 | WLM+PON |
| Willowleaf mandarin (<i>C. reticulata</i> Blanco) "WLM" 2n=2x=18 | Eureka lemon (<i>C. limon</i> L. Burm) "EUR" 2n=2x=18 | WLM+EUR |
| Willowleaf mandarin (<i>C. reticulata</i> Blanco) "WLM" 2n=2x=18 | Shamouti orange (<i>C.sinensis</i>) "SHO" 2n=2x=18 | WLM+SHO |
| Star ruby grapefruit (<i>C. paradisi</i> Mactad) "SRG" 2n=2x=18 | Willowleaf mandarin (<i>C. reticulata</i> Blanco) "WLM" 2n=2x=18 | WLM+SRG |
| Star ruby grapefruit (<i>C. paradisi</i> Mactad) "SRG" 2n=2x=18 | Mexican lime (<i>C. aurantifolia</i>) "MEL" 2n=2x=18 | SRG+MEL |
| Star ruby grapefruit (<i>C. paradisi</i> Mactad) "SRG" 2n=2x=18 | Corsican citron (<i>C. medica</i> L) "COC" 2n=2x=18 | SRG+COC |
| Mexican lime (<i>C. aurantifolia</i>) "MEL" 2n=2x=18 | Shamouti orange (<i>C.sinensis</i>) "SHO" 2n=2x=18 | MEL+SHO |

Table 2: Characteristics of selected SSR markers used for Nucellar/zygotic hybrids identification in seedlings of studied somatic hybrids and them diploid fusion parents

| SSR | EMBL accession number | Reverse sequence(5'→3') | Forward sequence (5'→3') | Tm (°C) |
|-------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|---------|
| mCrCIR02D03 | FR692360 | GACCATTTTCCACTCAA | CAGACAACAGAAAACCAA | 55 |
| mCrCIR02D09 | FR677569 | ACCCATCACAAAACAGA | AATGATGAGGGTAAAGATG | 55 |
| Ci02D11 | | TGAGTTTCAGTAAGTGTATGAG | GAGTTGACCGAGAAGATT | 55 |
| mCrCIR07D06 | FR677581 | TCAATTCCTCTAGTGTGTGT | CCTTTTCACAGTTTGCTAT | 55 |
| mCrCIR01C06 | AJ567393 | TGGAGACACAAAGAAGAA | GGACCACAACAAAGACAG | 50 |
| Ci02C09 | FR692359 | TCCCCGTCTCCTACC | TACTGACTGACCCCACC | 50 |
| mCrCIR03F05 | FR692364 | TAAAATCCAAGGTTCCA | CTAAGGAAGAGTAGAGAGCA | 50 |

Table 3: Flower characteristics of studied somatic hybrids and their diploid fusion parents

| Genotypes | Flower diameter (mm) | Petals length (mm) | Number of petals | Number of stamens | Percentage of hermaphrodite flowers (%) | Color | Flowering period (Year days) |
|---------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|------------|------------------------------|
| WLM (2x) | 4.87 ± 0.1 ^a | 12.3 ± 0.2 ^a | 7.3 ± 0.2 ^b | 13.1 ± 0.5 ^a | 100 | White | 115-146 |
| EUR (2x) | 7.06 ± 0.1 ^b | 19.3 ± 0.3 ^b | 5.1 ± 0.1 ^a | 36.8 ± 0.5 ^c | 16.67 | Anthocyane | 112-148 |
| WLM+EUR (4x) | 7.68 ± 0.1 ^c | 19.5 ± 0.3 ^b | 5 ± 0 ^a | 29 ± 0.5 ^b | 50 | Anthocyane | 115-140 |
| WLM (2x) | 4.87 ± 0.1 ^b | 12.3 ± 0.2 ^a | 7.3 ± 0.2 ^b | 13.1 ± 0.5 ^a | 100 | White | 114-146 |
| PON (2x) | 1.7 ± 0.02 ^a | 31.26 ± 0.6 ^c | 5 ± 0 ^a | 22.4 ± 0.7 ^b | 100 | White | 55-85 |
| WLM+PON (4x) | 9.31 ± 0.1 ^c | 23.33 ± 0.6 ^b | 4.8 ± 0.1 ^a | 22.2 ± 0.6 ^b | 100 | White | 109-136 |
| WLM (2x) | 4.87 ± 0.1 ^a | 12.3 ± 0.2 ^a | 7.3 ± 0.2 ^c | 13.1 ± 0.5 ^a | 100 | White | 115-146 |
| SRG (2x) | 7.33 ± 0.1 ^b | 19.8 ± 0.3 ^c | 4 ± 0 ^a | 24.3 ± 0.3 ^c | 83.33 | White | 114-141 |
| WLM+SRG (4x) | 7.3 ± 0.1 ^b | 18.1 ± 0.2 ^b | 4.6 ± 0.1 ^b | 18.6 ± 0.2 ^b | 91.67 | White | 118-140 |
| SRG (2x) | 7.33 ± 0.1 ^a | 19.8 ± 0.3 ^a | 4 ± 0 ^a | 24.3 ± 0.3 ^a | 83.33 | White | 114-141 |
| COC (2x) | 10.6 ± 0.1 ^c | 26.73 ± 0.5 ^b | 4.8 ± 0.1 ^b | 29.8 ± 0.4 ^c | 100 | White | 110-138 |
| SRG+COC (4x) | 8.3 ± 0.1 ^b | 28 ± 0.6 ^b | 4 ± 0 ^a | 27.7 ± 0.3 ^b | 16.67 | White | 115-140 |
| MEL (2x) | 4.7 ± 0.1 ^a | 9.5 ± 0.1 ^a | 5 ± 0 ^a | 17.1 ± 0.3 ^a | 100 | Anthocyane | 114-140 |
| SHO (2x) | 6.62 ± 0.1 ^c | 17.5 ± 0.5 ^b | 4.3 ± 0.1 ^b | 17.7 ± 0.2 ^a | 100 | White | 115-146 |
| MEL+SHO (4x) | 5.93 ± 0.1 ^b | 19.86 ± 0.3 ^c | 5 ± 0 ^a | 19.9 ± 0.4 ^b | 100 | Anthocyane | 110-138 |
| SRG (2x) | 7.33 ± 0.1 ^b | 19.8 ± 0.3 ^c | 4 ± 0 ^a | 24.3 ± 0.3 ^b | 83.33 | White | 114-141 |
| MEL (2x) | 4.7 ± 0.1 ^a | 9.5 ± 0.1 ^a | 5 ± 0 ^a | 17.1 ± 0.3 ^a | 100 | Anthocyane | 114-140 |
| SRG+MEL (4x) | 7.8 ± 0.1 ^c | 17.66 ± 0.3 ^b | 5 ± 0.3 ^a | 26 ± 0.4 ^c | 75 | Anthocyane | 114-139 |
| WLM (2x) | 4.87 ± 0.1 ^a | 12.3 ± 0.2 ^a | 7.3 ± 0.2 ^b | 13.1 ± 0.5 ^a | 100 | White | 115-146 |
| SHO (2x) | 6.62 ± 0.1 ^b | 17.5 ± 0.5 ^b | 4.3 ± 0.1 ^a | 17.7 ± 0.2 ^b | 100 | White | 115-146 |
| WLM+SHO (4x) | 6.97 ± 0.1 ^b | 20.66 ± 0.4 ^c | 4.4 ± 0.2 ^a | 19.3 ± 0.4 ^c | 100 | White | 117-138 |

Data are mean ± SE of three measurements. Different letters (a. b. c) indicate significant differences (a = 5%). Flowering period per days starting the first day of the year

Table 4: Percentage of micropollen formed and pollen fertility and size of studied somatic hybrids and its fusion parents

| Genotype | Pollen stainability (%) | pollen germination (%) | Pollen size (µm) | Micropollen (%) |
|----------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| SHO | 46 ± 0.1 ^b | 5 ± 0.01 ^b | 26.1 ± 0.8 ^b | 0.8 ± 0.002 ^c |
| MEL | 32 ± 0.07 ^a | 16 ± 0.03 ^c | 21 ± 0.6 ^a | 0 ^a |
| MEL+SHO | 32 ± 0.07 ^a | 2 ± 0.004 ^a | 26.5 ± 0.8 ^b | 0.2 ± 0.001 ^b |
| COC | 78 ± 0.17 ^c | 76 ± 0.17 ^c | 32.6 ± 1 ^b | 0 ^a |
| SRG | 31 ± 0.07 ^a | 4 ± 0.008 ^a | 24.2 ± 0.7 ^a | 1.2 ± 0.004 ^b |
| SRG+COC | 71 ± 0.16 ^b | 16 ± 0.04 ^b | 34.5 ± 1 ^c | 3 ± 0.005 ^c |
| WLM | 96 ± 0.21 ^c | 96 ± 0.22 ^c | 23.8 ± 0.7 ^a | 0 ^a |
| SRG | 31 ± 0.07 ^a | 4 ± 0.008 ^a | 24.2 ± 0.7 ^a | 1.2 ± 0.004 ^b |
| WLM+SRG | 35 ± 0.07 ^b | 6 ± 0.01 ^b | 27.8 ± 0.08 ^b | 2.4 ± 0.005 ^c |
| EUR | 20 ± 0.04 ^a | 5 ± 0.01 ^a | 28.1 ± 0.8 ^b | 0.4 ± 0.001 ^b |
| WLM | 96 ± 0.21 ^c | 96 ± 0.22 ^c | 23.8 ± 0.7 ^a | 0 ^a |
| WLM+EUR | 26 ± 0.06 ^b | 11 ± 0.02 ^b | 28.8 ± 0.9 ^b | 3.6 ± 0.01 ^c |
| WLM | 96 ± 0.21 ^c | 96 ± 0.22 ^c | 23.8 ± 0.7 ^b | 0 ^a |
| PON | 92 ± 0.21 ^b | 63 ± 0.14 ^b | 16.9 ± 0.5 ^a | 0.2 ± 0.001 ^b |
| WLM+PON | 40 ± 0.08 ^a | 5 ± 0.01 ^a | 32.5 ± 1 ^c | 0 ^a |
| WLM | 96 ± 0.21 ^c | 96 ± 0.22 ^c | 23.8 ± 0.7 ^a | 0 ^a |
| SHO | 46 ± 0.1 ^b | 5 ± 0.01 ^b | 26.1 ± 0.8 ^b | 0.8 ± 0.002 ^b |
| WLM+SHO | 29 ± 0.06 ^a | 2 ± 0.001 ^a | 33.8 ± 0.8 ^c | 7.2 ± 0.007 ^c |
| SRG | 31 ± 0.07 ^a | 4 ± 0.008 ^b | 24.2 ± 0.7 ^b | 1.2 ± 0.004 ^b |
| MEL | 32 ± 0.07 ^a | 16 ± 0.03 ^c | 21 ± 0.6 ^a | 0 ^a |
| SRG+MEL | 37 ± 0.08 ^a | 0 ^a | 29.5 ± 0.6 ^c | 8.4 ± 0.008 ^c |

Data are mean ± SE of three measurements. Different letters (a. b. c) indicate significant differences (a = 5%)

Table 5: Average seed number and embryo number per seed in somatic hybrids and its diploid fusion parents

| Genotype | Number of seeds | Number of embryo/seed |
|-----------------|----------------------------|------------------------------|
| COC | 148.7 ± 15.04 ^c | 1 ± 0 ^a |
| SRG | 1.7 ± 1.34 ^a | 4.91 ± 0.49 ^b |
| SRG+COC | 60.6 ± 5.7 ^b | 1.07 ± 0.11 ^a |
| WLM | 11.7 ± 4.27 ^b | 6.4 ± 0.64 ^c |
| SRG | 1.7 ± 1.34 ^a | 4.91 ± 0.49 ^b |
| WLM+SRG | 2.2 ± 1.23 ^a | 1.44 ± 0.15 ^a |
| EUR | 6.7 ± 2.87 ^a | 1.73 ± 0.17 ^a |
| WLM | 11.7 ± 4.27 ^b | 6.4 ± 0.64 ^c |
| WLM+EUR | 9.7 ± 1.89 ^b | 4.27 ± 0.43 ^b |
| WLM | 11.7 ± 4.27 ^a | 6.4 ± 0.64 ^b |
| PON | 40 ± 6.32 ^c | 2.04 ± 0.21 ^a |
| WLM+PON | 18.6 ± 2.88 ^b | 6.31 ± 0.63 ^b |
| WLM | 11.7 ± 4.27 ^b | 6.4 ± 0.64 ^c |
| SHO | 0.9 ± 0.74 ^a | 4.91 ± 0.49 ^b |
| WLM+SHO | 1.7 ± 1.34 ^a | 1.36 ± 0.14 ^a |
| SRG | 1.7 ± 1.34 ^a | 4.91 ± 0.49 ^c |
| MEL | 5.2 ± 1.48 ^b | 3.07 ± 0.31 ^b |
| SRG+MEL | 2.4 ± 1.07 ^a | 1.91 ± 0.19 ^a |

Data are mean ± SE of three measurements. Different letters (a. b. c) indicate significant differences (a = 5%)

Table 6: Ploidy and percentage of zygotics in somatic hybrids and parents seedlings

| Genotype | Seedlings ploidy | | | | Percentage of zygotes in seedlings |
|----------------|------------------|-----|------|----|---------------------------------------|
| | 2X | 3X | 4X | 6X | |
| COC | 100% | - | - | - | 100% |
| SRG | 100% | - | - | - | 2% |
| SRG+COC | - | - | 100% | - | 95% |
| WLM | 100% | - | - | - | 7% |
| SRG | 100% | - | - | - | 2% |
| WLM+SRG | 1% | 10% | 84% | 5% | 70% |
| EUR | 100% | - | - | - | 53% |
| WLM | 100% | - | - | - | 7% |
| WLM+EUR | - | - | 100% | - | 0% |
| WLM | 100% | - | - | - | 7% |
| PON | 100% | - | - | - | 22% |
| WLM+PON | - | - | 100% | - | 12% |
| WLM | 100% | - | - | - | 7% |
| SHO | 100% | - | - | - | 5% |
| WLM+SHO | - | 6% | 91% | 3% | 71% |
| SRG | 100% | - | - | - | 2% |
| MEL | 100% | - | - | - | 45% |
| SRG+MEL | - | 1% | 99% | - | 18% |

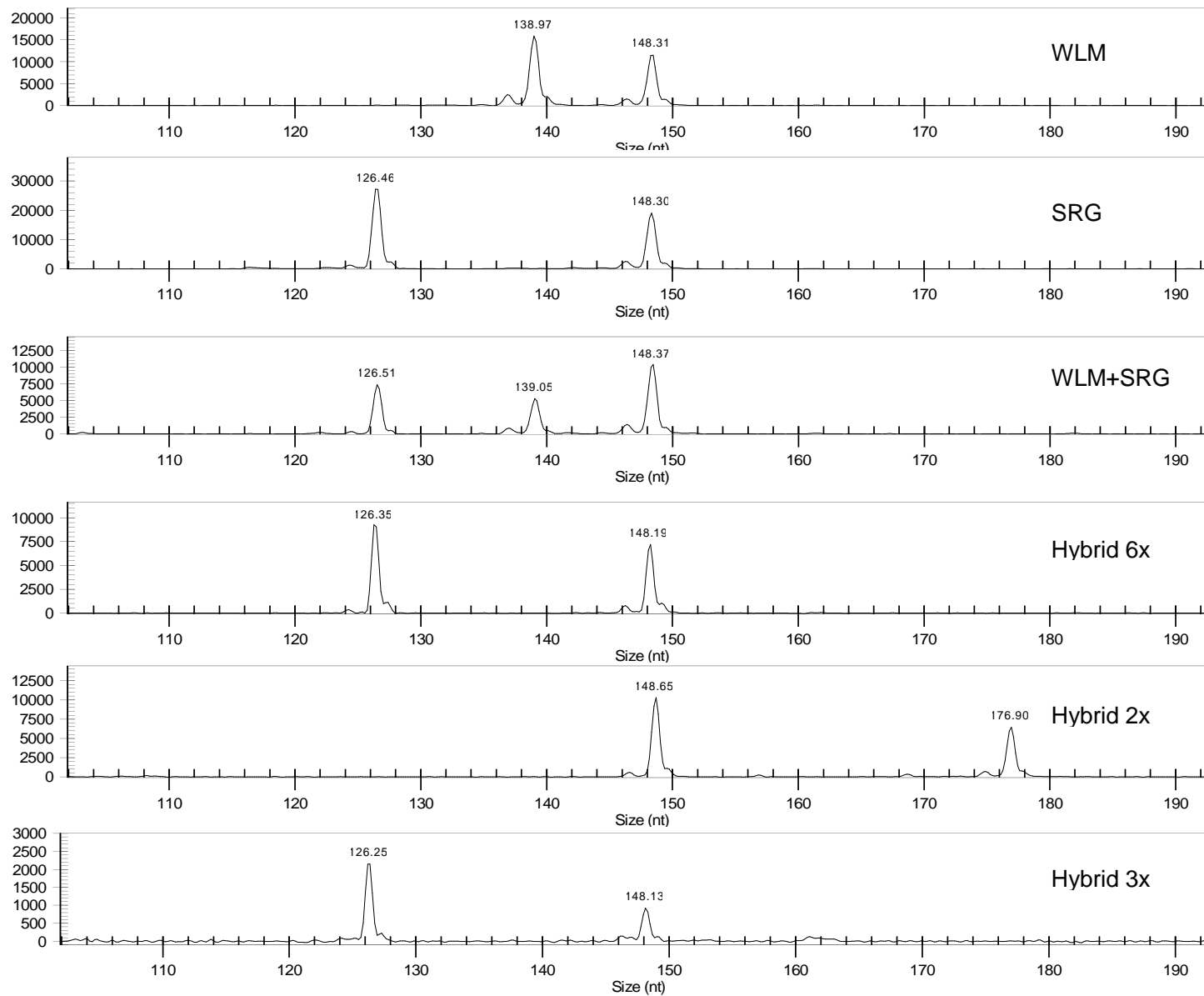


Figure 1

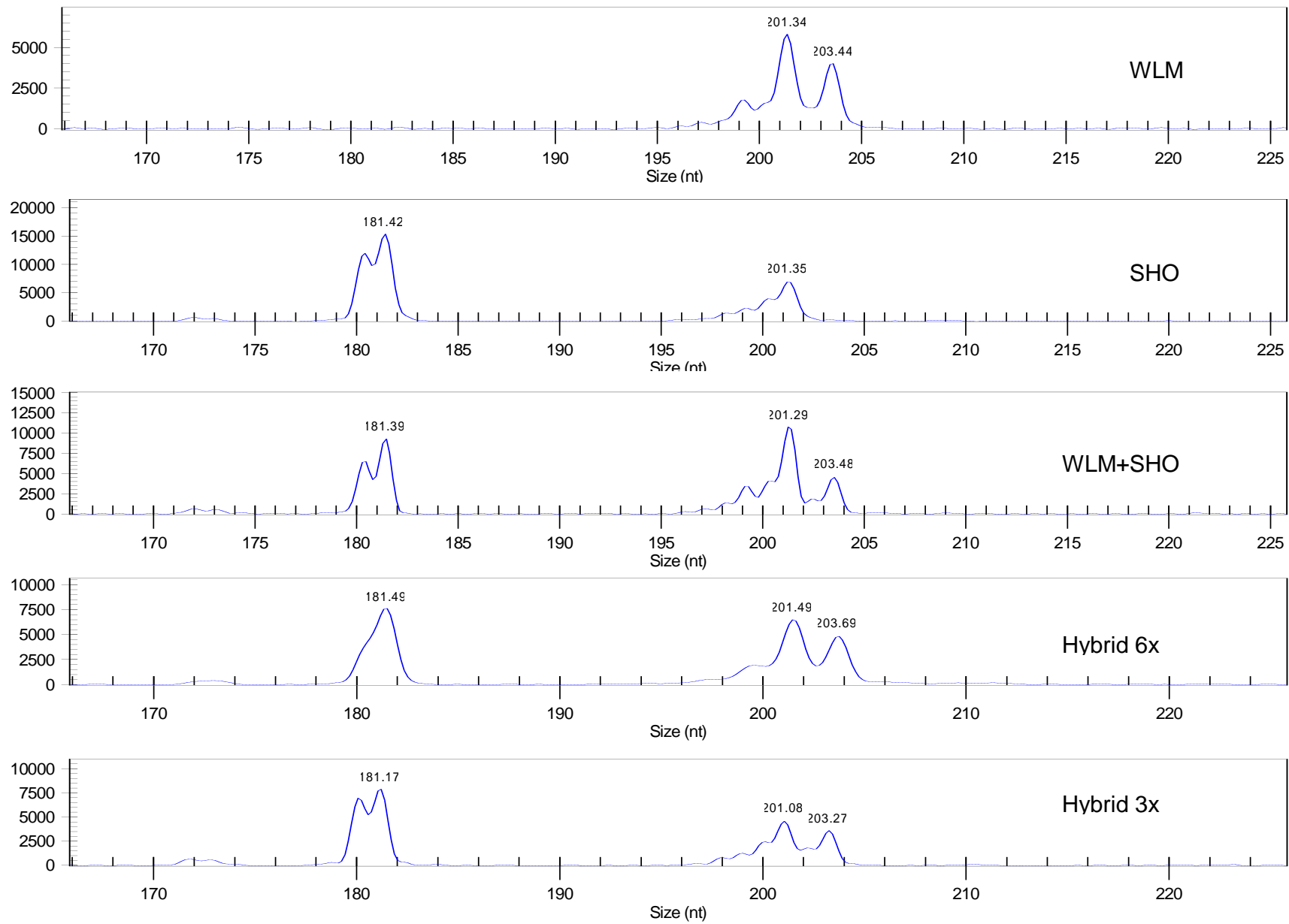


Figure 2

IV.2 ORIGINES GENETIQUES DES VARIATIONS DE PLOÏDIE DANS LES DESCENDANCES DE CROISEMENTS DE TYPE 2X X 4X IMPLIQUANT DES HYBRIDES SOMATIQUES D'AGRUMES

IV.2.1 Résumé de l'article

Introduction

L'obtention de variétés d'agrumes stériles produisant des fruits sans pépins, est l'un des principaux objectifs des sélectionneurs d'agrumes. La triploïdie répond à cet objectif puisqu'elle entraîne généralement une stérilité mâle et femelle, empêchant toutes pollinisations croisées sur des cultivars autoincompatibles. Combinée à la parthénocarpie, la triploïdie permet d'obtenir des fruits sans pépin. L'hybridation entre diploïdes et tétraploïdes est couramment utilisée dans le règne végétal pour générer des triploïdes. Chez les agrumes, elle est en théorie, la méthode la plus appropriée pour obtenir un grand nombre de triploïdes. Cependant, peu de tétraploïdes naturels d'agrumes sont disponibles, représentant un frein à l'utilisation de cette méthode. L'hybridation somatique entre parents diploïdes a permis de solutionner cette problématique, en diversifiant le pool de parents tétraploïdes utilisables dans les croisements interploïdaux visant à créer des triploïdes aspermes.

Toutefois, certaines populations issues de croisements entre diploïdes et tétraploïdes ont montré une hétérogénéité au niveau de la ploïdie. En effet, la majorité des plants obtenus sont triploïdes mais certains génotypes s'avèrent être diploïdes et tétraploïdes. Afin d'étudier l'origine de ces différents niveaux de ploïdie, une analyse de la microsporogenèse ainsi qu'une étude à l'aide de marqueurs SSR polymorphes ont été réalisés.

Matériels et méthodes

Trois croisements ont été sélectionnés pour leurs variations de ploïdie dans la descendance :

- Mandarinier "Fortune" (*Citrus reticulata* Blanco.) (FOM) ($2n=2x=18$) et l'hybride somatique entre mandarinier Willow leaf (*Citrus reticulata* Blanco.) (WLM) et pomelo Star ruby (*C. paradisi* Mactad) (SRG) « WLM+SRG ».
- Citronnier "Eureka" (*Citrus limon* (L) Burm) (EUR) ($2n=2x=18$) et l'hybride somatique entre SRG et cédratier Corse (*C. medica* L) (COC) « SRG+COC ».
- EUR et l'hybride somatique entre Limettier Mexicain (*C. aurantifolia*) (MEL) et oranger Shamouti (*C. sinensis* L) (SHO) « MEL+SHO ».

L'évaluation de la ploïdie réalisée par cytométrie en flux a été complétée par comptage chromosomique. Une étude moléculaire par marqueurs SSR polymorphes a ensuite été réalisée sur les trois descendances obtenues, par électrophorèse capillaire pour étudier l'origine de l'hétérogénéité de ploïdie dans ces descendances.

Résultats et discussion

Les trois croisements réalisés sont caractérisés par un nombre faible de pépins normaux comparé au nombre de pépins avortés ou mal formés.

La majorité des plants obtenus après germination des pépins issus des trois croisements est triploïde. Néanmoins, les résultats de la cytométrie en flux ainsi que le comptage chromosomique ont révélés la présence, en plus des triploïdes, de plants diploïdes et tétraploïdes. L'utilisation des marqueurs SSR en électrophorèse capillaire a permis de déterminer l'origine de ces différences de ploïdie observés. En effet, grâce au dosage allélique (MAC-PR) il a été établi que les tétraploïdes obtenus dans les trois croisements sont issus de la fécondation d'un gamète femelle non réduit $2n$ par un pollen diploïde.

Chez les diploïdes, deux origines génétiques distinctes ont été caractérisées. Les diploïdes issus des croisements EUR x SRG+COC et EUR x MEL+SHO sont d'origine nucellaire tandis que les diploïdes issus du croisement FOM X WLM+SRG sont zygotiques. En effet, l'analyse génétique de ces derniers diploïdes a été réalisée à l'aide de 15 marqueurs SSR distribués sur huit des neuf groupes de liaison de la carte génétique de la clémentine. Les résultats obtenus montrent que ces diploïdes sont issus d'une fécondation entre un gamète femelle haploïde et un gamète mâle haploïde. Ainsi, l'hybride somatique tétraploïde WLM+SRG a été capable de produire des gamètes haploïdes viables.

IV.2.2 Article

Titre: Different genetic events responsible for ploidy variation in Citrus interploidal crosses involving Citrus somatic hybrids

Mourad Kamiri, Ikbal Srairi, Dominique Dambier, Bouchra Chaidi, Patrick

Ollitrault et Yann Froelicher

Article à Soumettre à Plant Cell Reports

Mourad Kamiri^{1, 2}, Ikbâl Srâiri², Dominique Dambier³, Bouchra Chaidi², Patrick Ollitrault³ and Yann Froelicher¹

Different genetic events responsible for ploidy variation in Citrus interploidal crosses involving Citrus somatic hybrids

1. Unité de Recherche Multiplication végétative, CIRAD San Giuliano, F-20230 France.

2. Domaines Abbes Kabbage, 325, Avenue Hassan II, Agadir, Morocco.

3. Unité de Recherche: Amélioration génétique des espèces à multiplication végétative, CIRAD TA A-75/02 Avenue Agropolis , 34398 Montpellier cedex 5 - FRANCE

Corresponding author:

Yann Froelicher

Unité de Recherche Multiplication végétative, CIRAD

F-20230 San Giuliano

France

Tel : +33 495595911

Email: froelicher@cirad.fr

ABSTRACT

One of the main objectives of citrus breeders is to obtain sterile mandarin, unable to fertilize the others varieties like Clementines and producing seedless fruits. Triploids are response to these criteria. One way for triploid creation is sexual cross between diploids and tetraploids. However the pool of natural tetraploids on *Citrus* was restricted and the somatic hybridization via protoplast fusion allowed the creation of tetraploid somatic hybrids that can be used as male parents in crosses with female diploids to generate triploids cultivars. Among different sexual crosses realized, most gave triploid seedling but, three of them presented different level of ploidy in progenies.

These crosses were performed between “Fortune” mandarin and “Willowleaf” mandarin + “Star Ruby” grapefruit tetraploid somatic hybrid; “Eureka” lemon and “Star Ruby” grapefruit + “Corsican” citron tetraploid somatic hybrid; “Eureka” lemon and “Mexican” lime + “Shamouti” orange tetraploid somatic hybrid.

Indeed diploid and tetraploid plantlets were also observed in the three progenies.

In order to evaluate the origin of these diploids and tetraploids, pollinic evaluation of the somatic hybrids and a molecular study of the progenies were realized, using SSR markers coupled with PCR allele dosage effects. Microsporogenesis study revealed that two somatic hybrids “Willowleaf” mandarin + “Star Ruby” grapefruit and “Star Ruby” grapefruit + “Corsican” produces significantly higher level of micropollen than them diploid parents. Molecular analyzes revealed that tetraploids were issued from a diploid male and an unreduced female gametes. SSR study showed that diploids were issued from apomictic embryos or from a haploid female gamete and viable haploid male gamete issued from the tetraploid somatic hybrid. SSR study suggested that tetraploid somatic hybrids have the ability to produce haploid viable gametes owed to meiotic dysfunction during chromosomes pairing in the somatic hybrid.

Key words: *Citrus*; somatic hybrids; ploidy; SSR markers, MAC-PR, allele dose, 2n gametes

INTRODUCTION

Citrus is the first world fruit production with 124 million tones produced in 2009 (FAOSTAT 2011). Many constraints as demands and preferences of consumers, resistance on biotic and abiotic stresses make it obligatory to adopt different programs for new cultivars development. Traditional sexual crossing in higher plants is an extremely regulated system of hybridization. However, this mode of hybrid creation in Citrus is limited due to the incompatibility barriers, sterility and facultative apomixis (Louzada, et al. 1993; Ollitrault and Jacquemond 1994).

In terms of quality, one important characteristic for fresh fruit market is seedlessness. Four important strategies were adopted for seedlessness, based on creation of self-incompatible cultivars, selection of spontaneous or induced sterility (Froneman, et al. 1996), cytoplasmic male sterility (Guo, et al. 2004; Yamamoto, et al. 1997) and triploids selection (Ollitrault, et al. 1996).

Production of triploids using tetraploids in interploid crosses is an effective method to obtain seedless cultivars (Esen and Soost 1972). Exploiting this method, high proportions of triploid plants were obtained using the tetraploid somatic hybrid as female parent (Cameron and Burnett 1978). However, (Esen and Soost 1972) had very low proportions of triploids using pollen of the tetraploid. Nonetheless, the limit of this method is the low number of Citrus natural tetraploids and monoembryonic ones, particularly. The use of colchicines for doubling diploids can be used as a strategy to produce tetraploids. However, it produces autotetraploids that may limit a combination of useful traits (Wu, et al. 2005). Protoplast fusion by somatic hybridization technique is an alternative way to obtain tetraploids with an entire nuclear genetic combination of fusion parents (Ollitrault, et al. 2000b). It allows the combination of different genotypes, sometimes difficult to hybridize by sexual crossing. In the last fifteen years, several hundred Citrus somatic hybrids were produced in many labs around the world (Grosser, et al. 1992; Grosser, et al. 2000; Ollitrault, et al. 2000b; Ollitrault, et al. 1996b).

Many interploid crosses with somatic hybrids were realized to obtain triploid progenies. In Citrus, using tetraploids as pollen parent has also been reported to give tetraploids in progeny (Esen and Soost 1972; Oiyama, et al. 1991). Furthermore, diploids, triploids and tetraploids plants have been obtained in sexual crosses involving Citrus somatic hybrids used to fertilize diploid lines (Deng, et al. 1996; Muhammad, et al. 2002; Tusa, et al. 1996). Recently, spontaneous tetraploids hybrids have been obtained by interploidal crosses between diploid female parent and, in one hand, a citrus allotetraploid somatic hybrid and in the other hand an autotetraploid (Ferrante, et al. 2009).

In this paper, we present results of crosses between 2 diploids as female parents and 3 tetraploid somatic hybrids, previously obtained. Instead of obtaining complete triploid progenies, different ploidy levels, diploids, triploids and tetraploids, were observed among these sexual progenies. To reveal the origin of these different ploidy levels, we have used cytological and polymorphic SSR analyzes, conjugated with allele dosage technique, to access the gametic constitution of the obtained progenies.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Three fertile somatic hybrids ($2n = 4x = 36$) were previously obtained by protoplast fusion between different diploid parents (Ollitrault, et al. 2000b). Firstly, between diploid ($2n = 2x = 18$) *Citrus reticulata* Blanco (“Willowleaf” mandarin SRA 133) (WLM) and diploid *C. paradisi* Mactad (“Star Ruby” grapefruit SRA 293) (SRG) hereafter referred to as WLM+SRG. Secondly, between SRG and diploid *C. medica* L (“Corsican” citron SRA 613) (COC), hereafter referred to as SRG+COC. Finally, between diploid *C. aurantifolia* (“Mexican” lime SRA 140) (MEL) and diploid *C. sinensis* L. (“Shamouti” sweet orange SRA 299) (SHO), hereafter referred to as MEL+SHO. In order to obtain triploids, three sexual crosses were performed in the San Giuliano Research Station (Corsica, France):

C. reticulata Blanco (“Fortune” mandarin SRA 31) (FOM) ($2n=2x=18$) x “WLM + SRG”;

Citrus limon (L) Burm (“Eureka” lemon SRA 4) (EUR) ($2n=2x=18$) x “SRG + COC”;

Citrus limon (L) Burm (“Eureka” lemon SRA 4) (EUR) ($2n=2x=18$) x “MEL+SHO”.

Fruits were collected and seeds were recovered. Seeds were cultivated *in vitro* in MT medium (Murashige and Tucker 1969) with addition of 30 g l^{-1} sucrose and 1 mg l^{-1} GA3. Obtained plants were grafted on *C. limonia* Osbeck (Volkameriana).

Pollen stainability, germinability and size evaluation

Pollen stainability was used to indicate pollen viability. Fresh anthers of studied somatic hybrids and them parents were squashed and stained following Alexander’s method (Palma-Silva, et al. 2004). Stainability rate was determined using 300 pollen grains per anther (3 flowers and 3 anthers from each flower were analyzed). Diameters pollen grains were measured under a NIKON Eclipse 80i microscope using LUCIA software version 5.0.

Pollen germination was measured using solid germination medium (0.8% agar, 0.25% boric acid and 200 G/L sucrose). Pollen of 8 flower buds was spread and cultured in dark at room temperature. Three replicates were used for each sample and the germination rate was calculated on the basis of 300 pollen grains. Experiments were repeated 3 times.

Ploidy level determination

Ploidy level was determined by flow cytometry. Approximately 0.5 cm² of plantlet leave was chopped with a 0.5 cm² of *C. madurensis* (2x) as control in a 250 µl of a nuclei extraction buffer (Partec Cystain UV PreciseP). The solution obtained was filtered (pore size of 30 µm) to eliminate cell debris. After filtration, 800 µl of staining buffer (Partec, Cystain UV Precise P Staining Buffer) was added for DNA staining. The sample was analyzed with UV excitation in a Partec flow cytometer (PA-I; Partec, Munster, Germany).

Chromosome counts were performed using young leaves treated in 0.04% hydroxyquinoline for 4 h at room temperature then were fixed for 48h in 3:1 ethanol:acetic acid and stored at 4°C in 70% ethanol. Chromosome preparation was performed as described in D'Hont et al (1996). The chromosomes were counterstained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) and were observed under a NIKON Eclipse 80i microscope.

DNA extraction

DNA extraction, from leaves, was performed by using a modified mixed alkyl trimethyl ammonium bromide (MATAB) procedure (Gawel and Jarret 1991). The concentration of DNA was determined DNA using Hoechst 33258 protocol. Samples were then diluted with MQ sterile Water and stored at -20°C until used.

SSR amplification and analysis

60 SSR markers, defined in our laboratory (Froelicher, et al. 2008; Luro, et al. 2008), were tested using parents, looking for markers showing enough polymorphism between parents. Used markers, directly labeled by WELLRED fluorochrome (PA-2(dye2), PA-3(dye3) or PA-4(dye4), Beckman-Coulter) were synthesized by Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com>). PCR reactions were realized in 20 µl with 1x Taq buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.8U Taq DNA polymerase, 10 ng template DNA, 0.2 mM dNTPs, 0.4 µM forward primer and 0.4 µM reverse primer. Amplifications were performed, in MWG AG Primus 96 plus thermocycler, by 40 PCR cycles (94°C for 5 min, 94°C for 30s, primer temperature (50 or 55°C) for 1min, 72°C for 45s then 72°C for 4 minutes). Fragment analysis

and allele calling was done using the CEQ 8800 genetic analyzer and software, respectively (Beckman Coulter, Fulerton, CA, USA).

Raw data obtained were analyzed using GenomeLab CEQ8800 Genetic Analysis System version 8.0.52. The mobility calibration settings for each dye were done using the default settings for the internal size standard. To estimate allele dose, the signal intensity was used, because, correlated to the allele dose and so to the allele copy number (Landerogott, et al. 2006).

RESULTS

Somatic hybrids characterization

Ploidy, chromosome count and molecular characterization were realized for the three somatic hybrids (MEL+SHO; SRG+COC and WLM+SRG). Flow cytometry and chromosome counting confirmed the presence of 36 chromosomes in each of the three tetraploid somatic hybrids (Figure 1).

Molecular markers were chosen to display polymorphism between the parents of three somatic hybrids and enabled us to identify their genomic origin. 19, 20 and 46 SSR primers showed enough polymorphism between somatic hybrids parents and exhibited the addition of diploid parents alleles in MEL+SHO, SRG+COC and WLM+SRG somatic hybrids, respectively. Nevertheless, because they were crossed with “Eureka” lemon 5 SSR markers revealed enough allelic polymorphism to analyze EUR X MEL+SHO and EUR X SRG+COC progenies, respectively (Table 1). Concerning the third cross, FOM X WLM+SRG, 14 SSR markers, localized in eight of the nine linkage groups of the Clementine genetic map (Ollitrault, et al. 2011) were selected to reveal the genetic origin of obtained progeny (Table 1).

Pollen stainability, germinability and size evaluation of somatic hybrids and diploid parents

WLM+SRG and SRG+COC pollen stability (35% and 71% respectively) was intermediate to diploid fusion parents. MEL+SHO pollen stainability was equivalent to that of MEL (Table 2).

Pollen germination is described in Table 2. SHO and MEL showed low pollen germination (5% and 16%), while that of MEL+SHO was even lower (2%). However, pollen germinations of SRG+COC (16%) and WLM+SRG (6%) were intermediate to those of their diploid parents. WLM+SRG and SRG+COC average pollen size was higher to that of their fusion

parents while MEL+SHO average pollen size was comparable to that of SHO. However, pollen grain populations, in somatic hybrids, showed an important size variability pictured by the presence of different size classes: voluminous, intermediate and small grains. Pollen size standard deviations in WLM+SRG was 1.69 and 2.67 times higher than that of SRG and WLM respectively, and in SRG+COC, it was 1.25 and 1.63 times higher than that of SRG and COC respectively. However, pollen size in the third somatic hybrid was homogenous.

Observed results showed that micropollen percentage in WLM+SRG (Figure 2) and SRG+COC (2.4% and 3% respectively) was also higher than their parents, while in MEL+SHO (0.33%) it was lower than in its fusion parents (Table 2).

Progenies ploidy analyzes and chromosomes counts

All the progenies were characterized by a large number of aborted seeds (Table 3). In FOM X WLM+SRG cross, a total of 125 seeds were collected. Three types of seeds were found: 55 fully seeds, 10 partially developed seeds which required *in vitro* embryo rescue and 60 empty seeds. All the fully seeds germinated whereas the partially developed seeds had a low germination (only 3 plantlets) even the *in vitro* embryo rescue. After recovering, flow cytometry analysis revealed ploidy heterogeneity in the progeny, with 5 tetraploid, 8 diploid and 45 triploid plantlets.

In EUR X SRG+COC cross, three types of seeds were also observed, 23 fully developed, only one partially developed and 20 empty seeds. Twenty four plantlets were obtained in this cross, 11 of them were triploid, however five samples were tetraploid and eight were diploids.

In the third cross EUR X MEL+SHO, a total of 21 seeds were collected, 9 fully developed, 2 partially developed and 10 empty seeds. Flow cytometry analyzes revealed also heterogeneity in the progeny ploidy levels. 5 diploid, 5 triploid and only one tetraploid plantlets were obtained.

Chromosome counting on the obtained plantlets confirmed the cytometry results (Figure 3).

Progenies SSR analyzes

The three crosses showed different ploidy levels in progeny. Different origin of seedling progeny may be expected followed by the occurrence of gamete types ($x - 2x - 3x$) and embryo origins (zygotic vs. nucellar).

“Fortune” mandarin x “Willowleaf” mandarin + “Star Ruby” grapefruit tetraploid somatic hybrid

The FOM X WLM+SRG progeny showed different ploidy levels. To understand the origin of FOM X WLM+SRG progeny, SSR analyzes were realized. 8 SSR markers, that presented allelic polymorphism between parents, were selected. The triploid (FTr1) is originated, as expected, from haploid female gamete and 2n male one as showed in Table 4.

SSR analyzes revealed also that obtained tetraploids can be issued from an unreduced 2n female and 2n male gametes. Indeed, at mCrCIR01F04a locus, FOM and WLM+SRG were genotyped “ac” and “abde” respectively while “F1” tetraploid hybrid, was genotyped “abcc”. Indeed, a height peak ratio can be computed between heights in progeny and parents. Because of a low polymorphism between the parents, it was not easy to differentiate between tetraploids issued from a 2n female gamete and those that could result from a supposed 3n male gamete. Thus, at mCrCIR01F04a locus, FOM and WLM+SRG genotype were “ac” and “abde” respectively while “F1” tetraploid hybrid, showed “abcc” as genotype. Indeed, a height peak ratio can be computed between heights in progeny and parents. This ratio represents an ideal tool to identify alleles with double or triple dose effects. Double dose of allele “c” in “F1” led to conclude that this hybrid was issued from an unreduced female gamete “cc” and a diploid male gamete “ab”. The same observations were realized at Ci03B05 locus. In fact, at this locus, FOM and WLM+SRG were genotyped “cc” and “abcd” respectively, and triple dose of allele “c” in the five obtained tetraploid hybrids showed clearly that they originated from an unreduced female gamete genotyped “cc”.

Though, WLM+SRG genotype using EST 131 was “abcc” while FOM was “bb”. Three tetraploid hybrids showed 3 peaks and the two others only 2 peaks. However, a double dose on allele “b” was clearly distinguished in samples F1 (Figure 4), F2 and F4. In tetraploids F3 and F5 a triple dose effect was observed at allele “b”. These results can suppose that obtained tetraploid hybrids were issued from 2n female and 2n male gametes. A 2n female gamete can also be supposed as the origin of these tetraploids at Ci03E06, Ci03H05, Ci02C09, Ci02D03, Ci07C09 and EST291 loci.

SSR analysis, using 15 markers distributed in eight of the nine linkage groups of the Clementine genetic map (Ollitrault, et al. 2011), affirmed that the eight diploids detected by flow cytometry were zygotic, issued from a haploid viable male gamete. In fact, using SSR markers, diploidy was well determined by the number and height of peaks for heterozygous samples. “F6” (2x) presented an allele from FOM and a second allele from SRG at five loci (mCrCIR01F04a, Ci02C09, Ci02D09, Ci03C08 and EST291). Even so, “F6” hybrid

presented WLM alleles at eight other loci (TAA15, Ci03D12a, Ci02D04b, Ci03E06, Ci03B05, Ci03H05, Ci07C09 and EST131). At Ci02D03, because of null allele on SRG, and at Ci05A04 because of less polymorphism, it was not possible to establish the exact allelic origins of F1 at these loci. The same result is observed in “F12” (2x) where null alleles were identified in WLM and SRG at Ci03E06, EST291 and Ci02D03 loci. Yet, “F12” hybrid showed WLM alleles at five loci (TAA15, Ci03C08, Ci 05A04, Ci03B05 and EST131) and SRG alleles at 4 other loci (Ci03H05, Ci02D09, Ci03D12a, Ci02D04b, Ci02C09, Ci07C09 and mCrCIR01F04a) (Figure 4). The same observations were obtained at the six other diploid hybrids and SSR analysis results are summarized in (Table 5).

As well as they confirmed the diploidy in these eight plantlets, the 15 SSR markers localized in eight linkage groups, showed that these diploids possesses WLM and SRG at the different studied loci (Table 6). Thus, these diploids have a zygotic origin.

The use of localized SSR markers, made it possible to observe genetic recombinations in six diploid hybrids. Indeed, F9, F12 and F13 showed both WLM and SRG alleles in loci belonging to linkage group 2. The same observations were realized for F11 and F13; F6 and F13 and F10 in linkage groups 8, 9 and 4 respectively (Table 5).

“Eureka” lemon and “Mexican” lime + “Shamouti” orange tetraploid somatic hybrid

A total of 11 plantlets were derived from EUR X MEL+SHO. 5 diploids, 5 triploids and unique tetraploid plantlets were distinguished in the obtained progeny. To determine the origin of these plantlets, their parental genotypes were examined using 5 polymorphic SSR between parents (Table 6).

These markers showed that the obtained triploids were issued from haploid female and diploid male gametes. SSR genotyping analyzes, using Ci02D11 (Figure 5), showed that the tetraploid hybrid, genotyped “abde”, was issued from the union of an unreduced female gamete “bd” and a diploid gamete “ae” issued from MEL+SHO somatic hybrid. EST 241 genotype of this tetraploid hybrid “abce” demonstrated the same result as in Ci02D11 locus.

Moreover, according to the number and height of observed peaks in this tetraploid hybrid at EST 1525, Ci01H05, and mCrCIR07B05 loci (genotyped “bbdd”, “aacc” and “aabb” respectively), double dose effects were detected in the single peaks observed suggesting the same origin as observed at Ci02D11 and EST 241 loci. Hence, using the five SSR markers, genotypes of the obtained diploids were exactly the same as EUR suggesting their nucellar origin.

“Eureka” lemon and “Star Ruby” grapefruit + “Corsican” citron tetraploid somatic hybrid

24 plantlets issued from EUR X SRG+COC cross showed also differences in ploidy level. Thus, cytometry analysis revealed that 4 were tetraploids, 11 triploids and 9 diploids. When genotyped, all triploids plantlets showed that they were issued from the same origin as in the previous crosses, meaning 1n female and 2n male gametes. Effectively, the Ci01H05 genotype of SRG+COC somatic hybrid was “aacc” and EUR genotype was “b0” when Etr1’ was genotyped “abc”. The same observations were realized at the other studied loci (Figure 5). EUR produced 2n gametes genotyped “b0” causing tetraploid formation (samples: E1’, E2’ and E3’) and a 2n gamete genotyped “bb” (sample E4’) (Table 6). In effect, the height of peaks was related to the allele dose. Double dose effect was observed in E2’, E3’ and E4’ tetraploids concerning allele “c” and allele “a” for E1’, when compared the intensity of the single alleles “b” and “d” in this locus. By this way, the same result was observed using EST 1. Indeed, a 2n female gamete genotyped “cc” is responsible for these tetraploid hybrids formation. Using Ci06A05b, COC showed only one peak. However peaks ratio in sample E3’ (4x) indicates that there was only a single dose for each allele (Figure 5). This result showed the presence of null allele in Ci06A05b locus for COC. The same observation was made in EST 520 loci in E4’ (4x). Thence, genetic analyzes using these markers suggest that the tetraploid hybrids in progeny were due to an unreduced female gamete.

Diploids were also observed in the progeny of EUR X SRG+COC cross. The SSR analysis using Ci06A05b, EST1 and EST520 showed that these diploids have the same genotype as EUR. However, because of common allele between EUR and COC at these loci, it was not possible to distinguish between nucellars and zygotics in these diploids. Nevertheless, Ci01H05, completely polymorphic between COC and EUR, showed that all of these diploids have the same genotype as the seed parent revealing their apomictic origin.

DISCUSSION

Genetic events responsible for ploidy variation

Protoplast somatic hybridization has been used to widen the pool of tetraploids for interploid crosses to produce triploid cultivars (Grosser, et al. 2000). In fact, a low set of completely developed seed, compared to total seed number, have been observed in the three obtained progenies. In citrus interploid crosses (2x X 4x), aborted seeds were first reported by (Esen and Soost 1973). Esen et Soost (1971) made a relationship between endosperm embryo ploidy and seed size. A normal seed development could be preserved if a ratio 2:3 between the

embryo and endosperm ploidies is respected (Esen and Soost 1973). Abortion of triploid embryos was reported as being due to altered embryo/endosperm (EBN) ratio (Esen and Soost 1973).

In studied crosses, majority of triploids were obtained but also few diploids and tetraploids. The aim of this work was to identify the origin of obtained diploids and tetraploids. Thereby, cytometric analysis and SSR markers allowed us to characterize this progeny becoming from 2x X 4x crosses. The use of MAC-PR (microsatellite DNA allele counting-peak ratio) method was very helpful to determine the allelic structure in the obtained progenies. Indeed, it allowed estimation of the allelic copy number and by this way identification of differential amplification intensities in polyploids (Cuenca, et al. submitted; Esselink, et al. 2004) and identification of ploidy levels variations in the obtained progenies.

Obtained results demonstrated that 2n female gametes were responsible for tetraploids formation in EUR x SRG+COC and EUR x MEL+SHO progenies. Since the first interploid sexual cross using a somatic hybrid (Oiyama, et al. 1991), the majority of progeny issued was triploid, some rare tetraploid were also identified as deriving from a 2n female gamete (Ferrante, et al. 2009). In the other cross, FOM x WLM+SRG, only “F12” hybrid showed clearly its origin: 2n female gamete clearly identified at mCrCIR01F04a locus. In fact, Fortune mandarin (*C. reticulata* Blanco) is known to be a complete monoembryonic mandarin with a high rate of 2n gamete producing (Cuenca, et al. accepted). This can be correlated with the SSR analysis of the tetraploid hybrids obtained in FOM x WLM+SRG cross; they can be issued from diploid seed parent gamete. 2n gametes formation can take place during abnormal meiosis stages. 2n gametes can be produced during first division restitution (FDR) by a failure in spindle formation that inhibits chromosome migration and normal disjunction at meiosis II. They can also be a result of second division restitution (SDR) leading to normal separation of homologous chromosomes and no cell plate formation to separate sister chromatids (Chen, et al. 2008). Moreover, Bretagnolle and Thompson (1995) mentioned that FDR and SDR may occur concurrently in single plant species. 2n gametes formation is considered as an important way of polyploidization (Gallo, et al. 2007). Their formation modes can be determined by computing frequencies of maternal heterozygosity restitution in the progeny. Though, this was not possible because of the low number of tetraploids in the three progenies. Recently, Cuenca et al (submitted) evaluated the mechanism for 2n megagametophyte production in FOM and assumed that SDR was responsible for 2n gametes formation in this mandarin.

The use of SSR markers allowed also checking out the genetic origins of the obtained diploid plants. Certainly, the use of entirely polymorphic markers between parents is perfection;

however allele dose, displayed as peak heights, make it easy to identify tetraploids genotypes in a three or two peaks chromatographs.

Diploids issued from EUR X MEL+SHO and EUR X SRG+COC crosses had the same genotypes as EUR, meaning they were originated from nucellar embryos. Nonetheless, Deng et al (1996) and Tusa et al (1996) observed diploids in progeny of an interploid crosses. Obviously, Hwang (1991) and Perez-Tornero and Porras (2008) indicated that lemon is not completely monoembryonic (around 56 %). In fact, EUR could be classified as having a limited or moderated polyembryony. Partial polyembryony on EUR, resulting in apomictic seedlings, could be causative for diploids apparition in progenies of EUR X SRG+COC and EUR X MEL+SHO crosses.

Otherwise, zygotic diploids were detected using SSR markers and allele dose in FOM x WLM+SRG. SSR analysis of the eight diploids descended from FOM X WLM+SRG revealed that they were not issued from nucellar embryos. Assuredly, these diploids possess alleles from both WLM and SRG alleles at different loci. For a given individual, alleles of WLM and SRG were observed at different loci in eight linkage groups. This result suggests that WLM+SRG tetraploid somatic hybrid is able to produce viable haploid pollen that could be micropollen observed during WLM+SRG microsporogenesis. By crossing diploid pearl millet with near tetraploids male parent, in order to determine the chromosomal characteristics of obtained progeny, 10 diploids have been obtained (Dujardin and Hanna 1990). In potato, Hanneman and Peloquin (1968) observed that 3,3 % of a progeny of 676 individuals issued from 2x X 4x cross, was diploid. Obtaining diploids in this cross suggests monoploid pollen production by the male parent. Anyway, chromosome numbers observed in young microspores of this near tetraploid showed different ploidy levels.

This result validates different cytogenetic and microsporogenesis studies in Citrus somatic hybrids that showed high frequencies of micropollen and abnormal tetrads with many laggard chromosomes (Deng, et al. 1996; Kamiri, et al. Submitted). The use of SSR markers coupled with MAC-PR technique was an authentic way to determine the allelic configurations, and by this way the origin of 2x and 4x obtained by 2x X 4x in Citrus.

Pollen viability

WLM+SRG and MEL+SHO somatic hybrids exhibited intermediate germination and stainability rates between their fusion parents. However, MEL+SHO showed a lower germination rate (only 2%). Indeed, several citrus allotetraploid somatic hybrids were described to have intermediate pollen fertility levels (Chen, et al. 2004; Deng, et al. 1995).

Low germinations and stainability rates were consistent with observations made in several *Citrus* somatic hybrids (Grosser, et al. 2000; Ollitrault, et al. 2008). In fact, Chen et al. (2004) observed multivalents and univalents during meiosis in two *Citrus* somatic hybrids between Hamlin Orange+Rough Lemon and Key Lime+Valencia Orange. Multivalents formation prevent normal chromosome pairing leading to pollen with intermediate germination (Chen, et al. 2004). Furthermore, univalents frequency is negatively correlated to pollen fertility in *Citrus* (Del Bosco, et al. 1999) and positively to micropollen formation (Chen, et al. 2004). Variability in pollen size characterized the studied somatic hybrids. In fact, the rate of micropollen in WLM+SRG and SRG+COC was higher than their fusion parents, as observed for Hamlin sweet orange + Rough Lemon and Key lime + Valencia sweet orange somatic hybrids (Chen, et al. 2004). These micropollen grains are usually aneuploid (El Maâtaoui and Pichot 2001). Indeed, it was already established that the pollen diameter is positively correlated with DNA content and therefore ploidy level (El Maâtaoui and Pichot 2001). This could be causative of the high rate of aborted seeds (Ib 1984). Therefore, in our somatic hybrid, none correlation could be established between the increasing micropollen rate and diploid progenies. No aneuploid have been observed.

CONCLUSION

Citrus somatic hybrids furnish a great potential for transfer of interesting characters from fusion parents and lead to an interesting triploid progeny when used in interploid crosses. In theory, a 2x X 4x cross in *Citrus* must produce an entire triploid progeny. After all, different ploidy levels were observed by flow cytometry. The use of SSR markers was extremely helpful to determine the origins of these different ploidy levels. Even if SSR markers used weren't different between parents (can't be unequivocally tracked in progeny), allele dose in capillary electrophoresis was an effective and useful technique allowing to confirm ploidy results and to find out the donor parent responsible for tetraploids in progeny. These tetraploids were due to nuclear restitution during meiosis producing 2n female gametes. Partial polyembryony on EUR, resulting in nucellar seedlings, was causative for diploids apparition in progenies of EUR X SRG+COC and EUR X MEL+SHO. Otherwise, Zygotic diploids were detected using SSR markers and allele dose in the third cross. These diploids present both WLM and SRG alleles at different loci. These results suggest that a tetraploid somatic hybrid is able to produce viable haploid gametes.

LITERATURE CITED

1. Bretagnolle F, Thompson JD (1995) Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist* 129:1-22
2. Cameron JW, Burnett RH (1978) Use of sexual tetraploid seed parents for production of triploid Citrus hybrids. *HortScience* 13:167-169
3. Chen CL, Guo WW, Yi HL, Deng XX (2004) Cytogenetic analysis of two interspecific *Citrus* allotetraploid somatic hybrids and their diploid fusion parents. *Plant Breeding* 123:332-337
4. Chen CX, Lyon MT, O'Malley D, Federici CT, Gmitter J, Grosser JW, Chaparro JX, Roose ML, Gmitter FG, Jr. (2008) Origin and frequency of 2n gametes in *Citrus sinensis* * *Poncirus trifoliata* and their reciprocal crosses. *Plant Science* 174:1-8
5. Cuenca J, Froelicher Y, Aleza P, Juarez J, Navarro L, Ollitrault P (accepted) Multilocus half-tetrad analysis and centromere mapping in Citrus: Evidences of SDR mechanism for 2n megagametophyte production and partial chromosome interference in mandarin cv 'Fortune'. *Heredity*
6. Cuenca J, Froelicher Y, Aleza P, Juarez J, Navarro L, Ollitrault P (submitted) Multilocus half-tetrad analysis and centromere mapping in Citrus: Evidences of SDR mechanism for 2n megagametophyte production and partial chromosome interference in mandarin cv 'Fortune'. *Heredity*
7. D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, Rao S, Berding N, Glaszmann JC (1996) Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics* 250:405-413
8. Del Bosco SF, Tusa N, Conicella C (1999) Microsporogenesis in a *Citrus* interspecific tetraploid somatic hybrid and its fusion parents. *Heredity* 83:373-377
9. Deng X, Gmitter FG, Jr., Grosser JW (1995) Pollen fertility of auto- and allo-tetraploids of citrus. *Acta Agriculturae Sinica* 138-143
10. Deng XX, Yi HL, Li F, ., Guo W, . (1996) Triploid plants regenerated from crossing diploid pummelo and tangerine with allotetraploid somatic hybrid of citrus. *Proc Int Soc Citric* 1:189-192
11. Dujardin M, Hanna WW (1990) Haploid Pearl Millet Pollen from Near-Tetraploid Interspecific Pennisetum Hybrids. *Crop Science* 30:393-396

12. El Maâtaoui M, Pichot C (2001) Microsporogenesis in the endangered species *Cupressus dupreziana* A. Camus: evidence for meiotic defects yielding unreduced and abortive pollen. *Planta* 213:543-549
13. Esen A, Soost RK (1971) Unexpected triploids in Citrus: their origin, identification and possible use. *J Hered* 62:329-333
14. Esen A, Soost RK (1972) Tetraploid progenies from 2x X 4x crosses of Citrus and their origin. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 97:410-414
15. Esen A, Soost RK (1973) Seed development in citrus with special reference to 2x X 4x crosses. *American Journal of Botany* 60:448-462
16. Esselink GD, Nybom H, Vosman B (2004) Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting-peak ratios) method. *Theoretical and Applied Genetics* 109:402-408
17. FAOSTAT (2011) Food and Agriculture Organization of the United Nations. In: <http://faostat.fao.org/> (ed). <http://faostat.fao.org/>
18. Ferrante S, Lucretti S, Reale S, De Patrizio A, Abbate L, Tusa N, Scarano MT (2009) Assessment of the origin of new citrus tetraploid hybrids (2n = 4x) by means of SSR markers and PCR based dosage effects. *Euphytica* 173:223-233
19. Froelicher Y, Dambier D, Bassene JB, Costantino G, Lotfy S, Didout C, Beaumont V, Brottier P, Risterucci AM, Luro F, Ollitrault P (2008) Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Molecular Ecology Resources* 8:119-122
20. Froneman IJ, Breedts HJ, Koekemoer PJJ (1996) Promising seedless citrus selections from the ITSC mutation breeding programme. *Inligtingsbulletin - Instituut vir Tropiese en Subtropiese Gewasse* 12-16
21. Gallo PH, Micheletti PL, Boldrini KR, Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CBd (2007) 2n Gamete formation in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae). *Euphytica* 154:255-260
22. Gawel NJ, Jarret RL (1991) A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Mol Biol* 9:374-380
23. Grosser JW, Gmitter FG, Jr., Louzada ES, Chandler JL (1992) Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development. *HortScience* 27:1125-1127

24. Grosser JW, Ollitrault P, Olivares-Fuster O (2000) Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36:434-439
25. Guo WW, Prasad D, Cheng YJ, Serrano P, Deng XX, Grosser JW (2004) Targeted cybridization in citrus: transfer of Satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness. *Plant Cell Reports* 22:752-758
26. Hanneman RE, Peloquin SJ (1968) Ploidy levels of progeny from diploid-tetraploid crosses in the potato *American Journal of Potato Research* 45:255-261
27. Hwang AS (1991) The polyembryony and identification of zygotic seedlings of lemon. *Jour Agric Res China* 40(2):225-232
28. Ib L-L (1984) Giemsa C-banding of barley chromosomes. *Hereditas* 100:219-223
29. Kamiri M, Stift M, Srairi I, Costantino G, El Moussadik A, Hmyene A, Bakry F, Ollitrault P, Froelicher Y (Submitted) Evidence for non-disomic inheritance in a *Citrus* interspecific tetraploid somatic between *C. reticulata* and *C. lemon* hybrid using SSR markers and cytogenetic analysis. *Plant Cell Reports*
30. Kijas JMH, Thomas MR, Fowler JCS, Roose ML (1997) Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 94:701-706
31. Landergott U, Naciri Y, Schneller JJ, Holderegger R (2006) Allelic configuration and polysomic inheritance of highly variable microsatellites in tetraploid gynodioecious *Thymus praecox* agg. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 113:453-465
32. Louzada ES, Grosser JW, Gmitter FG, Jr. (1993) Intergeneric somatic hybridization of sexually incompatible parents: Citrus sinensis and Atalantia ceylanica. *Plant Cell Reports* 12:687-690
33. Luro F, Costantino G, Terol J, Argout X, Allario T, Wincker P, Talon M, Ollitrault P, Morillon R (2008) Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (Citrus clementina Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping. In, p 287
34. Muhammad U, Ramzan M, Fatima B, Jaskani MJ, Khan MM (2002) Citrus germplasm enhancement by interploid hybridization 1. Reciprocal crosses of Kinnow and Succari. *International Journal of Agriculture and Biology* 4:208-210
35. Murashige T, Tucker DPH (1969) Growth factor requirements of tissue culture. *Proc First Intl Citrus Symp* 3:1155-1161

36. Oiyama I, Kobayashi S, Yoshinaga K, Ohgawara T, Ishii S (1991) Use of pollen from a somatic hybrid between Citrus and Poncirus in the production of triploids. HortScience 26:1082
37. Ollitrault P, Dambier D, Allent V, Luro F, Jacquemond C (1996) *In vitro* rescue and selection of spontaneous triploids by flow cytometry for easy peeler Citrus breeding
38. Proceedings of the Eighth International Citrus congress International Society of Citriculture, Sun City, South Africa 2:913-917
39. Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Carreel F, D'Hont A, Luro F, Bruyere S, Cabasson C, Lotfy S, Joumaa A, Vanel F, Maddi F, Treanton K, Grisoni M (2000b) Somatic hybridisation potential for Citrus germplasm utilization. Cahiers Agricultures 9:223-236
40. Ollitrault P, Dambier D, Luro F (1996b) Somatic hybridization in Citrus: some new hybrids and alloplasmic plants. Proceeding of International Society of Citriculture 2:
41. Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Froelicher Y (2008) Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. Plant Breeding Reviews 30:323-352
42. Ollitrault P, Jacquemond C (1994) Facultative apomixis, spontaneous polyploidization and inbreeding in Citrus volkameriana seedlings. In: Symposium on tropical orchards, Montpellier, France, 30 Aug-5 Sep, 1993, pp 398-400, 479-480
43. Ollitrault P, Terol J, Chen C, Federici CT, Lotfy S, Hippolyte I, Ollitrault F, Bérard A, Chauveau A, Costantino G, Kacar Y, Mu L, Cuenca J, Garcia A, Froelicher Y, Aleza P, Boland A, Billot C, Navarro L, Luro F, Roose M, Gmitter FG, Talon M, Brunel D (2011) A reference linkage map of *C. clementina* based on SNPs, SSRs and InDels
44. In: Plant and Animal Genome XIX Conference, San Diego, California, USA
45. Palma-Silva C, dos Santos DG, Kaltchuk-Santos E, Bodanese-Zanettini MH (2004) Chromosome numbers, meiotic behavior, and pollen viability of species of Vriesea and Aechmea genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. Journal of Botany 91:804-807
46. Perez-Tornero O, Porras I (2008) Assessment of polyembryony in lemon: rescue and in vitro culture of immature embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture 93:173-180
47. Tusa N, Fatta Del Bosco S, Nardi L, Lucretti S (1996) Obtaining triploid plants by crossing Citrus limon cv 'Feminello' 2n×4n Allotetraploid somatic hybrids. VIII Int Cong Citriculture, Int Soc Citr, South Africa 1:133-136
48. Wu J, Ferguson AR, Mooney PA (2005) Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid Citrus breeding. Euphytica 141:229-235

49. Yamamoto M, Matsumoto R, Okudai N, Yamada Y (1997) Aborted anthers of Citrus result from gene-cytoplasmic male sterility. *Scientia Horticulturae* 70:9-14

Figure Captions:

Figure 1: Flow cytometer analysis of 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained Citrus nuclei. 1: histogram of diploid Citrus *C. madurensis* (2x), 2: histogram of WLM + SRG somatic hybrid (4x).

Figure 2: Tetraploid somatic hybrids and fusion parents pollen stainability (20x): micropollen grains are observed in WLM+SRG (arrows)

Figure 3: Mitotic chromosome counts from young leaves preparation of tetraploids and diploid samples from the progeny of FOM x WLM+SRG cross. a and b : 36 and 18 chromosomes are counterstained, respectively, with DAPI.

Figure 4: Chromatographs of 4 SSR markers detected in parents (FOM, WLM, SRG, WLM+SRG somatic hybrid), a tetraploid (F1) and diploids (F6 and F12) issued from FOM X WLM+SRG obtained progeny.

Figure 5: Chromatographs of an SSR marker detected in parents and the interploidal progeny. A) Ci02D11 genotypes of EUR, MEL, SHO, MEL+SHO somatic hybrid, a tetraploid (E1'') a triploid (E Tr1') and diploid (E2'') issued from the obtained progeny. The tetraploid (E1'') is issued from a 2n female gamete and a 2n male pollen (allele from MEL and allele from SHO). (E2'') has only EUR alleles due to its nucellar origin and finally, as expected, E Tr1' is obtained using a haploid female and a 2n male gametes. B) Ci06A05b genotypes of EUR, SRG, COC, SRG+COC somatic hybrid, a tetraploid (E3') due to an unreduced female gamete a nucellar diploid (E5') and a triploid (E Tr1'').

Table 1: Characteristic of SSR markers used for FOM X WLM+SRGEUR X SRG+COC and EUR X MEL+SHO progenies molecular study

| Markers | Linkage group | EMBL accession number | Tm °C | Primer sequence (5'–3') | Alleles and product size | | |
|---------------|---------------|-----------------------|-------|-----------------------------------------------------|--------------------------|-------------|-------------|
| FOM X WLM+SRG | | | | | FOM | WLM | SRG |
| TAA15 | 1 | (Kijas, et al. 1997) | 55 | R: CTTCCCAGCTGCACAAGC F: GAAAGGGTTACTTGACCAGGC | cd(192-204) | cd(192-204) | ab(165-188) |
| mCrCIR02D09 | 2 | FR677569 | 55 | R: AATGATGAGGGTAAAGATG F: ACCCATCACAAAACAGA | bd(230-238) | cd(236-238) | ab(226-230) |
| mCrCIR03C08 | 2 | FR677576 | 55 | R: CAGAGACAGCCAAGAGA F: GCTTCTTACATTCTCAAA | c0(225) | ac(207-225) | bb(211) |
| EST 131 | 3 | FC912428 | 55 | R: TACCTCCACGTGTCAAACCA F: GCTGTCACGTGGGTGTATG | bb(159) | bc(159-165) | ac(154-165) |
| mCrCIR03D12a | 4 | FR677577 | 50 | R: GCCATAAGCCCTTTCT F: CCCACAACCATCACC | cc(216) | ad(251-280) | bc(253-261) |
| mCrCIR02D04b | 4 | FR677564 | 50 | R: CTCTCTTTCCCATTAGA F: AGCAAACCCACAAC | cc(209) | ad(199-229) | bc(201-209) |
| Ci05A04 | 5 | FR692372 | 55 | R: AAACGAGACAAGACCAAC F: TATCAAACCTCCCTCACT | bb(267) | ab(264-267) | aa(264) |
| Ci02D03 | 7 | FR692360 | 55 | R: CAGACAACAGAAAACCAA F: GACCATTTTCCAACCAA | ac(298-310) | ad(298-317) | b0(303) |
| Ci03E06 | 7 | FR692363 | 55 | R: AATACACCCTTCAAATCC F: CTCCTAACAGATTTCATTACTC | ab(133-137) | bb(137) | ac(133-139) |
| mCrCIR01F04a | 8 | AM489736 | 55 | R: AAGCATTAGGGAGGGTCACT F: TGCTGCTGCTGTTGTTGTTCT | ac(206-219) | bd(217-222) | ae(206-228) |
| Ci02C09 | 8 | FR692359 | 50 | R: TACTGACTGACCCCAACC F: TCCCGTCTCCTACC | bc(267-273) | cc(273) | ab(256-267) |
| EST 291 | 9 | FC886050 | 55 | R: CGCACTTGGCTTTACAT F: TCAATCAAGAAAAGAAAAGTCAGC | ab(198-206) | c0(209) | ab(198-206) |
| Ci07C09 | 9 | AJ567410 | 55 | R: GACCCTGCCTCCAAAGTATC F: GTGGCTGTTGAGGGGTTG | aa(259) | ac(259-269) | bd(265-275) |
| Ci03B05 | # | | 55 | R: CTTGAGGTTGAGCAGAA F: GCAGGAGAAATGGCTA | cc(216) | cd(216-224) | ab(197-205) |

| EUR X SRG+COC | | | | EUR | SRG | COC |
|---------------|----------|----|----------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| EST 241 | FC907629 | 55 | R: TGCTAGCCTGCTAGGGACTC F: TGGCTTCCAAATCACATCAA | ad(131-144) | ce(143-147) | ab(131-137) |
| EST 520 | FC879546 | 55 | R: CTCTGATATTCCCAAAGCCG F: AAGCACGTTATCGGGATCTG | ab(270-278) | c0(284) | b0(278) |
| EST 1 | FC916860 | 55 | R: CAAGCCTCTCTCTTTAGTCCCA F: AGTTCTTTGGTGCTTCAGGC | ce(190-206) | ab(182-186) | de(201-205) |
| Ci01H05 | AJ567401 | 55 | R: AAAACAACCAAAAGGACAAGATT L: TTCAAACTAAACAAACCAACTCG | b0(120) | aa(118) | cc(148) |
| Ci06A05b | AJ567407 | 50 | R: TCTCTGGTTGGTTTTTGTGA F: ATGATGAAAAGCAAGGGG | cc(217) | ad(209-247) | bb(215) |
| EUR X MEL+SHO | | | | EUR | MEL | SHO |
| EST 241 | FC907629 | 55 | R: TGCTAGCCTGCTAGGGACTC F: TGGCTTCCAAATCACATCAA | ae(131-144) | bc(137-141) | cd(141-144) |
| EST 1527 | FC882653 | 55 | R: GCGCGATCACTCTCTTTCTT F: ATCGGGTTTGGATTAGGGAC | bd(133-142) | cd(140-142) | aa(131) |
| Ci01H05 | AJ567401 | 55 | R: AAAACAACCAAAAGGACAAGATT F: TTCAAACTAAACAAACCAACTCG | c0(120) | aa(116) | bb(118) |
| Ci02D11 | | 55 | R: GAGTTGACCGAGAAGATT F: TGAGTTTCAGTAAGTGTATGAG | bd(195-203) | af(192-227) | ce(199-219) |
| mCrCIR07B05 | AM489747 | 50 | R: TTTGTTCTTTTGGTCTTTT F: CTTTCTTTCTCCTAGTTTCCC | aa(221) | bb(228) | cd(240-267) |

F: forward primer

R: reverse primer

Tm: Optimum annealing temperature

a. b. c. d. e. f: First letter. in alphabetical order. given to alleles correspond to the smallest size

0: null allele

Table 2: Percentages of micropollen, pollen stainability, germinability and size of the three studied somatic hybrids and their fusion parents

| Genotype | Stainability (%) | Germination (%) | pollen size (µm) | Pollen size standard deviation | Micropollen (%) |
|----------------|------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| WLM | 96 ± 0.21 ^c | 96 ± 0.22 ^c | 23.8 ± 0.7 ^a | 4 E-05 | 0 ^a |
| SRG | 31 ± 0.07 ^a | 4 ± 0.008 ^a | 24.2 ± 0.7 ^a | 6.34E-05 | 1.2 ± 0.004 ^b |
| WLM+SRG | 35 ± 0.07 ^b | 6 ± 0.01 ^b | 27.8 ± 0.8 ^b | 1.07E-04 | 2.4 ± 0.005 ^c |
| COC | 78 ± 0.17 ^c | 76 ± 0.17 ^c | 32.6 ± 1 ^b | 4.86E-05 | 0 ^a |
| SRG | 31 ± 0.07 ^a | 4 ± 0.008 ^a | 24.2 ± 0.7 ^a | 6.34E-05 | 1.2 ± 0.004 ^b |
| SRG+COC | 71 ± 0.16 ^b | 16 ± 0.04 ^b | 34.5 ± 1 ^c | 7.95E-05 | 3 ± 0.005 ^c |
| SHO | 46 ± 0.1 ^b | 5 ± 0.01 ^b | 26.1 ± 0.8 ^b | 4.56E-05 | 0.8 ± 0.002 ^c |
| MEL | 32 ± 0.07 ^a | 16 ± 0.03 ^c | 21 ± 0.6 ^a | 4.16E-05 | 0 ^a |
| MEL+SHO | 32 ± 0.07 ^a | 2 ± 0.004 ^a | 26.5 ± 0.8 ^b | 4.23E-05 | 0.2 ± 0.001 ^c |

Data are mean ± SE of three measurements. Different letters (a, b, c) indicate significant differences (a = 5%)

Table 3: Seed set and development in the three 2x X 4x crosses

| ♀ Parent 2x | ♂ Parent 4x | Number of obtained fruits | Number of | Number of plantlets | | | Total of obtained plantlets | |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------|---------------------|----|----|-----------------------------------|----|
| | | | | 2x | 3x | 4x | | |
| Fortune mandarine (<i>C. reticulata</i> Blanco) « FOM » | Willow leaf mandarin (<i>C. deliciosa</i>)+Star Ruby Grapefruit (<i>C. paradisi</i> <i>Mactad</i>) « WLM+SRG » | 25 | normal seeds | 55 | 7 | 43 | 5 | 55 |
| | | | partially developed | 10 | 1 | 2 | 0 | 3 |
| Eureka lemon SRA 4 (<i>Citrus limon</i> (L) Burm) « EUR » | Star Ruby Grapefruit(<i>C. paradisi Mactad</i>)+Corsica n citron (<i>C. medica L.</i>) « SRG+COC » | 9 | normal seeds | 23 | 9 | 11 | 3 | 23 |
| | | | partially developed | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Eureka lemon SRA 4 (<i>Citrus limon</i> (L) Burm) « EUR » | Mexican lime (<i>C. aurantifolia</i>)+ Shamouti orange (<i>C. sinensis L.</i>) « MEL+SHO » | 6 | normal seeds | 9 | 4 | 5 | 0 | 9 |
| | | | partially developed | 2 | 1 | 0 | 1 | 2 |

Table 4: Allelic configuration of a triploid and the 5 tetraploid plantlets obtained in the progeny of FOM X WLM+SRG progeny at 9 loci.

| Sample | Ploidy | SSR Genotypes | | | | | | | |
|----------------|--------|---------------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|--------------|
| | | Ci03E06 | Ci03B05 | Ci02D03 | EST131 | Ci02C09 | EST 291 | Ci07C09 | mCrCIR01F04a |
| FOM | 2 | ab | cc | ac | bb | bc | ab | aa | ac |
| WLM | 2 | b0 | cd | ad | bc | cc | c0 | ac | bd |
| SRG | 2 | ac | ab | b0 | ac | ab | ab | bd | ae |
| WLM+SRG | 4 | ab0c | abcd | ab0d | abcc | abcc | abc0 | abcd | abde |
| FTr1 | 3 | abb | ccd | ad0 | bac | bcc | abb | aac | ade |
| F1 | 4 | aabb | accc | acd0 | abbc | abcc | aab0 | aacd | abcc |
| F2 | 4 | bbc0 | bccc | acd0 | abbc | bccc | abbc | aaab | aabc |
| F3 | 4 | bbc0 | bccc | abc0 | abbb | bccc | abbc | aaab | aace |
| F4 | 4 | aab0 | accc | acd0 | abbc | abcc | aab0 | aacd | aade |
| F5 | 4 | bbb0 | accc | acd0 | abbb | bbcc | aaac | aaab | aacd |

FOM: Fortune mandarine (*C. reticulata* Blanco)

WLM : Willow leaf mandarin (*C. deliciosa*)

SRG: Star Ruby Grapefruit (*C. paradisi* Mactad)

WLM+SRG: Somatic hybrid

F Tr1: Triploid sample issued from the F OMx WLM+SRG cross

a. b. c. d. e. f: First letter. in alphabetical order. given to alleles correspond to the smallest size.

0: null allele

Table 5: Allelic configuration of diploid plantlets obtained in FOM X WLM+SRG progeny at 14 loci localized in eight linkage groups in a Clementine map.

| SSR Genotypes | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|--------|-------|---------|---------|--------|----------|----------|---------|----------|----------|---------|--------------|----------|---------|---------|
| Linkage Group | | 1 | 2 | 2 | 3 | 4 | 4 | 5 | 7 | 7 | 8 | 8 | 9 | 9 | # |
| Sample | Ploidy | TAA15 | Ci02D09 | Ci03C08 | EST131 | Ci03D12a | Ci02D04b | Ci05A04 | Ci03E06 | Ci02D03 | Ci02C09 | mCrCIR01F04a | EST 291 | Ci07C09 | Ci03B05 |
| FOM | 2 | cd | bd | c0 | bb | cc | cc | bb | ab | ac | bc | ac | ab | aa | cc |
| WLM | 2 | cd | cd | ac | bc | ad | ad | ab | b0 | ad | cc | bd | c0 | ac | cd |
| SRG | 2 | ab | ab | bb | ac | bc | bc | aa | ac | b0 | ab | ae | ab | bd | ab |
| WLM+SRG | 4 | abcd | abcd | abbc | abcc | abcd | abcd | aaab | ab0c | ab0d | abcc | abde | abc0 | abcd | abcd |
| F6 | 2 | cd | bb | b0 | bb | cd | cd | ab | bb or b0 | aa or a0 | bb | ac | ab | aa | cc |
| F7 | 2 | cd | bb | bc | ab | cc | bc | ab | aa or a0 | ab | bb | aa | aa or a0 | ac | bc |
| F8 | 2 | bd | bd | bc | bc | cd | ac | ab | ab | ac | cc | cd | aa or a0 | ad | cc |
| F9 | 2 | bd | cd | bc | bc | cd | cd | ab | bb or b0 | cd | bc | ab | bb or b0 | ac | cc |
| F10 | 2 | bd | bd | b0 | bb | cd | cc | bb | bc | bc | bc | ad | ab | ad | cd |
| F11 | 2 | bd | bb | bc | bb | cd | cd | ab | ab | c0 | cc | ce | ab | ad | ac |
| F12 | 2 | cd | bb | ac | bb | bc | bc | bb | aa or a0 | aa or a0 | bb | ae | bb or b0 | ad | cc |
| F13 | 2 | bc | bc | b0 | bc | cd | cd | bb | ab | bc | bb | bc | ab | ac | cd |

SRG alleles
WLM alleles

Table 6: Allelic configuration of diploid and tetraploid plantlets obtained in EUR X SRG+COC and EUR X MEL+SHO at 5 loci each.

| | | SSR Genotypes | | | | | |
|---------------|---------|---------------|---------|----------|---------|---------|-------------|
| | Sample | Ploidy | EST 241 | EST 520 | EST 1 | Ci01H05 | Ci06A05b |
| EUR X SRG+COC | EUR | 2 | ad | ab | ce | b0 | bc |
| | SRG | 2 | ce | cc | ab | aa | ad |
| | COC | 2 | ab | b0 | de | cc | b0 |
| | SRG+COC | 4 | abce | b0cc | abde | aacc | ab0d |
| | E1' | 4 | aacd | bbcc | bccd | aab0 | bbcc |
| | E2' | 4 | abcd | abb0 | acce | bcc0 | abc0 |
| | E3' | 4 | bdde | abcc | acce | bcc0 | abc0 |
| | E4' | 4 | abcd | abc0 | ccde | bbcc | abc0 |
| | ETr1' | 3 | abc | abc | abc | abc | aab |
| | E5' | 2 | ad | ab | ce | b0 | bc |
| | E6' | 2 | ad | ab | ce | b0 | bc |
| | E7' | 2 | ad | ab | ce | b0 | bc |
| | E8' | 2 | ad | ab | ce | b0 | bc |
| | E9' | 2 | ad | ab | ce | b0 | bc |
| | E10' | 2 | ad | ab | ce | b0 | bc |
| | E11' | 2 | ad | ab | ce | b0 | bc |
| | E12' | 2 | ad | ab | ce | b0 | bc |
| | E13' | 2 | ad | ab | ce | b0 | bc |
| | | | EST 241 | EST 1527 | Ci01H05 | Ci02D11 | mCrCIR07B05 |
| EUR X MEL+SHO | EUR | 2 | ae | bd | c0 | bd | aa |
| | MEL | 2 | bc | cd | aa | af | bb |
| | SHO | 2 | cd | aa | bb | ce | cd |
| | MEL+SHO | 4 | bccd | aacd | aabb | acef | bbcd |
| | E1" | 4 | abce | bbdd | aabb | abde | aabb |
| | ETr1" | 3 | abd | abc | aac | abf | abc |
| | E2" | 2 | ae | bd | c0 | bd | aa |
| | E3" | 2 | ae | bd | c0 | bd | aa |
| | E4" | 2 | ae | bd | c0 | bd | aa |
| | E5" | 2 | ae | bd | c0 | bd | aa |
| | E6" | 2 | ae | bd | c0 | bd | aa |

 EUR: Eureka lemon SRA 4 (*Citrus limon* (L) Burm)

 SRG : Star Ruby Grapefruit (*C. paradisi* Mactad)

 COC: Corsican citron (*C. medica* L.)

 MEL: Mexican lime (*C. aurantifolia*)

 SHO: Shamouti orange (*C. sinensis* L.)

SRG+COC and MEL+SHO: Somatic hybrids

EUR Tr1' and EUR Tr1": Triploids issued respectively from EUR x SRG+COC and EUR x MEL+SHO crosses

a. b. c. d. e. f: First letter, in alphabetical order, given to alleles correspond to the smallest size.

0: null allele

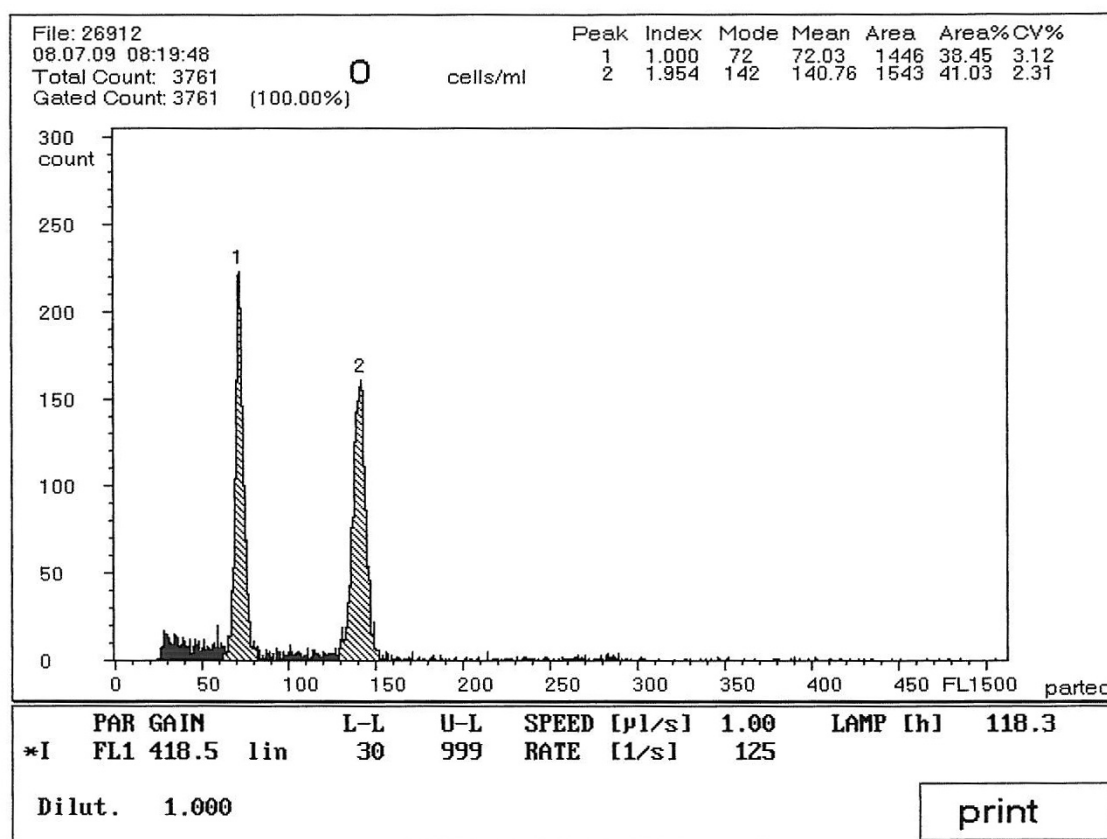


Figure 1

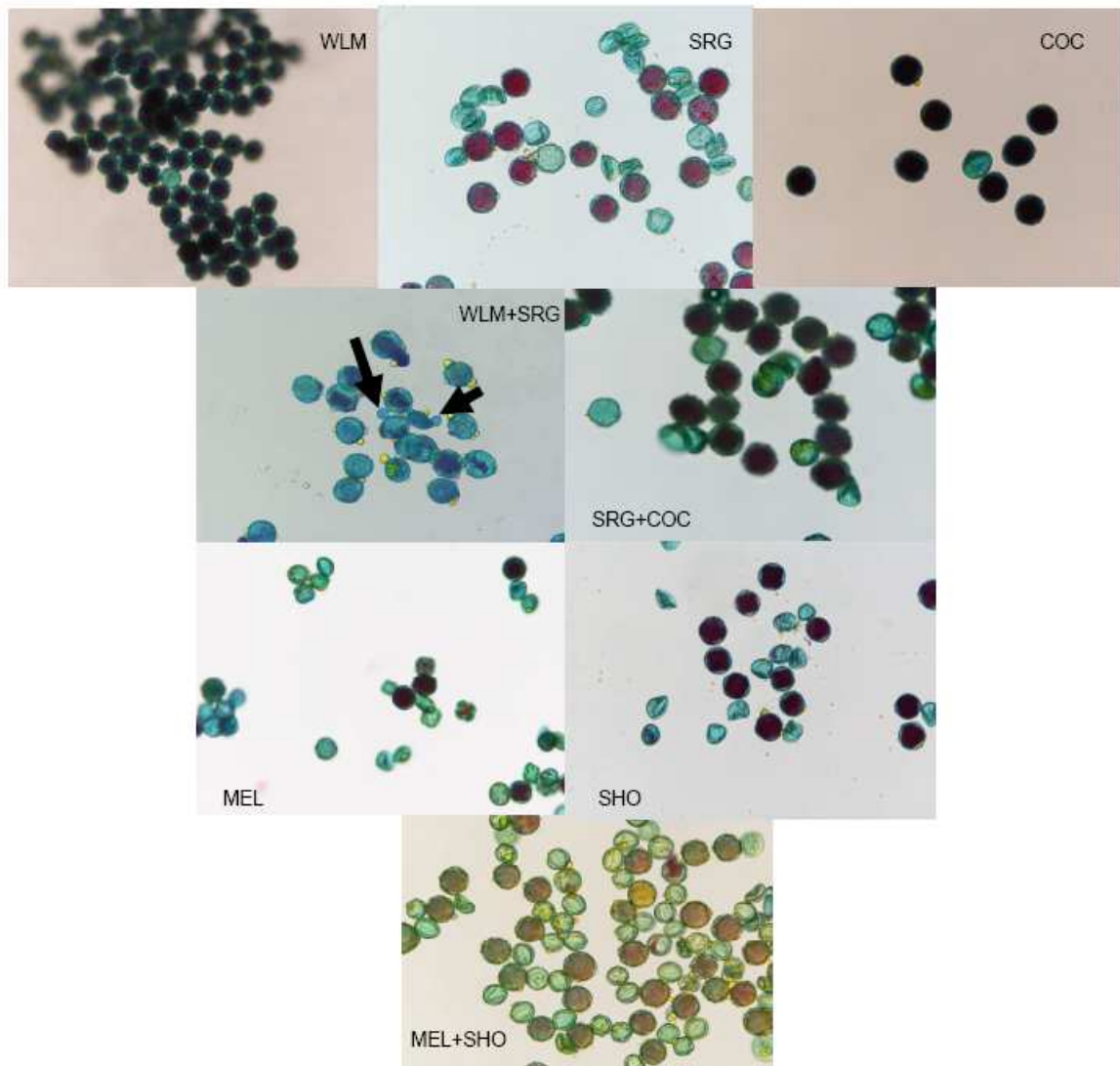


Figure 2

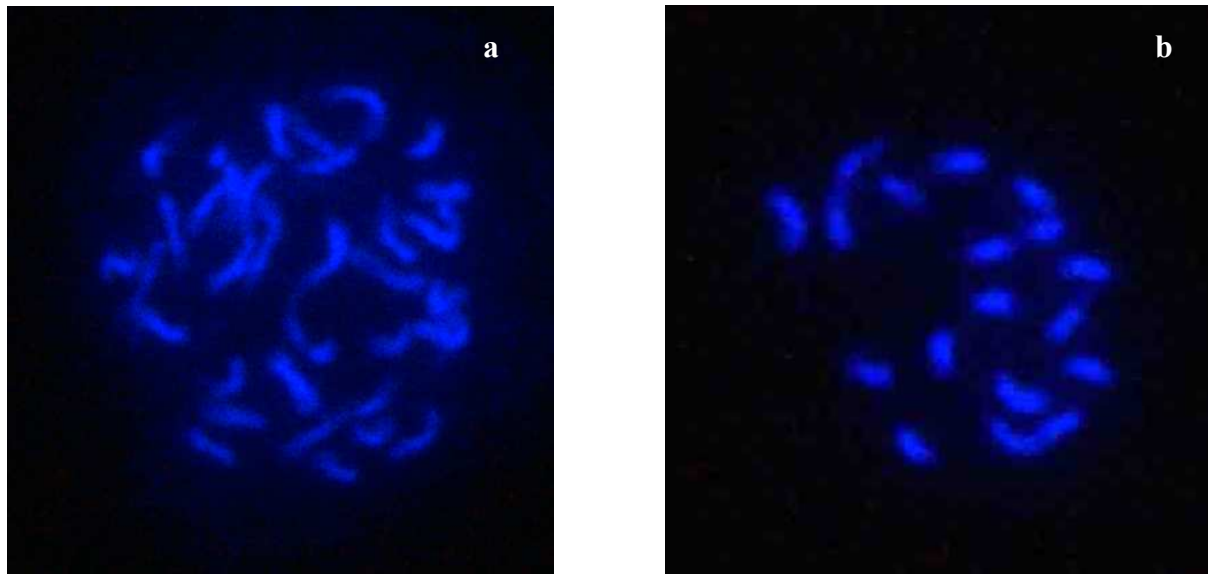


Figure 3

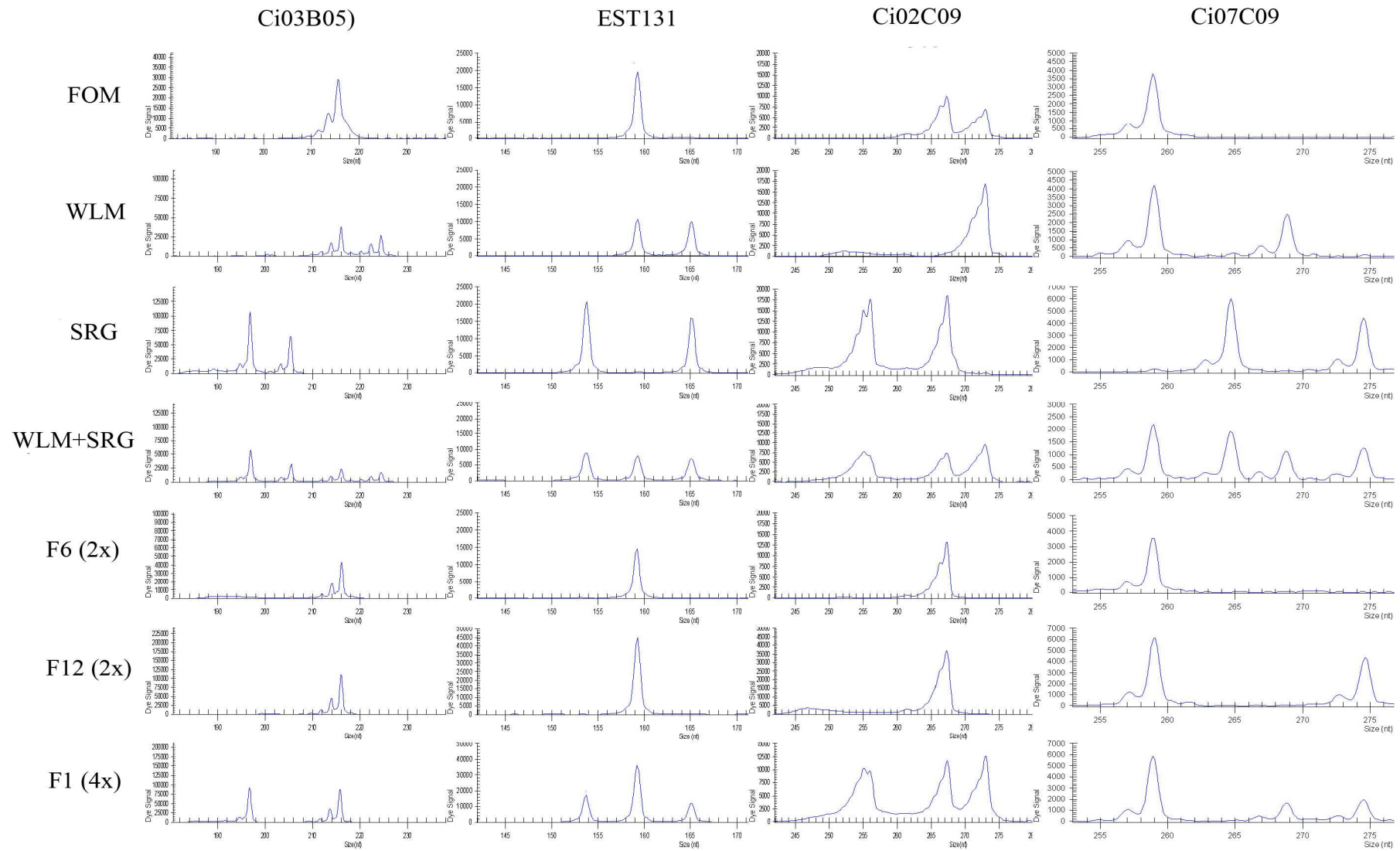


Figure 4

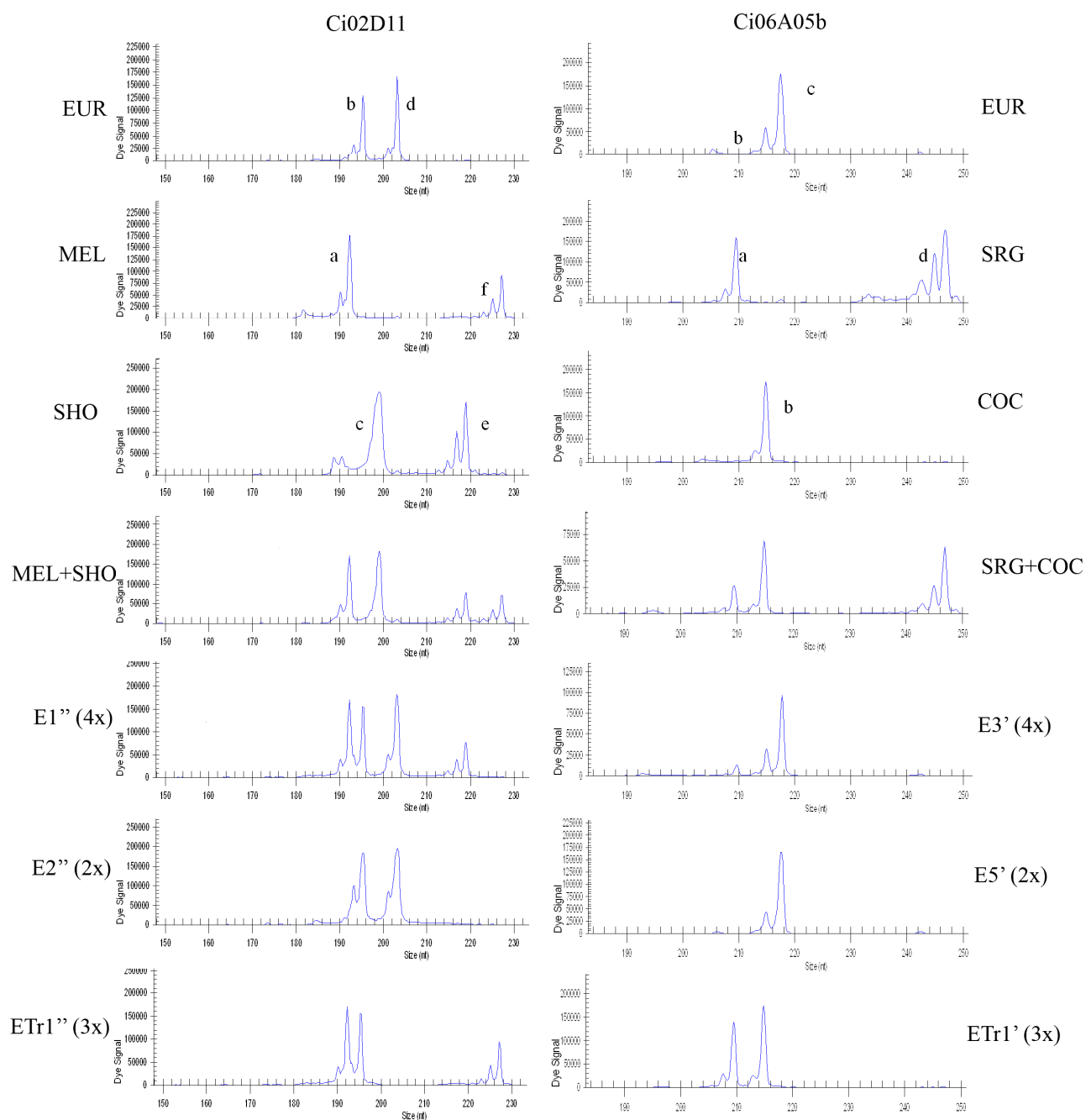


Figure 5

IV.3 ETUDE DE LA SEGREGATION ALLELIQUE CHEZ UN HYBRIDE SOMATIQUE INTERSPECIFIQUE ENTRE *CITRUS RETICULATA* ET *CITRUS LEMON*

IV.3.1 Résumé de l'article

Introduction

L'hybridation somatique est devenue une composante très importante des programmes de création variétale chez les agrumes à travers le monde. Cette technique a augmenté considérablement le nombre de polyploïdes, en particulier les tétraploïdes. Ces hybrides peuvent être intra ou interspécifique, voire même intergénérique. De nombreux croisements ont été réalisés entre diploïdes et hybrides somatiques interspécifiques tétraploïdes en vue d'obtenir des triploïdes. En effet, les triploïdes possèdent un potentiel commercial considérable en raison de l'absence de pépins. Au niveau mondial, la sélection de cultivars triploïdes prometteurs est, par conséquent, considérée comme un axe prioritaire par les sélectionneurs.

La création de ce matériel innovant soulève de nouvelles questions de recherche sur le comportement méiotique de ces hybrides somatiques ainsi que sur la structure génétique fine des gamètes produits. L'objectif de notre travail est d'étudier le comportement méiotique et le mode de ségrégation allélique chez un hybride somatique interspécifique allotétraploïde d'agrumes entre le mandarinier Willow leaf (*Citrus deliciosa* Ten.) et le citronnier Eureka (*Citrus limon* (L.) Burm.). Pour ce faire nous avons réalisé une étude histologique de la méiose couplée à une analyse de la ségrégation allélique à l'aide de marqueurs moléculaires d'une population triploïde issue d'un croisement de notre hybride somatique avec des fleurs de pamplemoussiers Chandler (*C. maxima*). Ce travail doit permettre de mieux prédire la constitution génétique des hybrides triploïdes.

Matériels et méthodes

L'étude de la méiose a été réalisée sur des anthères provenant de boutons de fleurs de l'hybride somatique mandarinier Willow leaf (*Citrus reticulata* Blanco.) et le citronnier Eureka (*Citrus limon* (L.) Burm appelé WLM+EUR. Les boutons floraux ont été récoltés à un stade de développement se rapprochant le plus de la méiose soit une taille de 4-5mm. L'étude de la ségrégation allélique a été réalisée sur une descendance issue d'un croisement entre

Pamplemoussier Chandler *Citrus maxima* (Burm.) Merr (CH) et l'hybride somatique WLM+EUR. L'évaluation de la ploïdie de la descendance obtenue a été effectuée par cytométrie en flux et confirmée par comptage chromosomique. En raison de leur nature co-dominante et du polymorphisme important, les marqueurs Simple Sequence Repeats (SSR), ont été utilisés pour la caractérisation moléculaire de cette descendance.

Résultats et discussion

L'analyse cytogénétique de la méiose de l'hybride somatique est caractérisée par la présence de différentes configurations chromosomiques. Les bivalents représentent la configuration majoritaire (76%) suivis des tétravalents (11%). 114 plants ont été obtenus après germination des pépins extraits et se sont révélés tous triploïdes. 17 marqueurs polymorphes entre les parents ont été sélectionnés pour l'étude de la ségrégation. L'analyse statistique des données est réalisée par une approche basée sur un calcul de vraisemblance. Les résultats de caractérisation moléculaire de 114 individus triploïdes issus du croisement CHA X WLM+EUR montrent une ségrégation intermédiaire et tétrasomique sur les différents loci étudiés. Ces résultats pourraient être liés aux parents, génétiquement proches, de l'hybride somatique. Ainsi, l'hétérozygotie intra et interparentale va pouvoir être transmise via les gamètes de l'hybride somatique. Le nombre de combinaisons alléliques est très élevé avec ce mode de ségrégation et doit être pris en considération lors de la mise en œuvre des stratégies de créations de triploïdes à des fins d'amélioration variétale.

IV.3.2 Article

Titre: Evidence for non-disomic inheritance in a Citrus interspecific tetraploid somatic between *C. reticulata* and *C. lemon* hybrid using SSR markers and cytogenetic analysis

Mourad Kamiri, Marc Stift, Ikbal Srairi, Gilles Costantino, Abdelhamid El Moussadik, Frédéric Bakry, Patrick Ollitrault et Yann Froelicher

Plant Cell Reports. Article soumis

Mourad Kamiri^{1, 2}, Marc Stift³, Ikbâl Sraïri², Gilles Costantino⁴, Abdelhamid El Moussadik⁵, Abdelaziz Hmyene⁶, Frédéric Bakry⁷, Patrick Ollitrault⁷ and Yann Froelicher¹

Evidence for non-disomic inheritance in a Citrus interspecific tetraploid somatic between *C. reticulata* and *C. lemon* hybrid using SSR markers and cytogenetic analysis

1. Unité de Recherche Multiplication végétative, CIRAD San Giuliano, F-20230 France.
2. Domaines Abbes Kabbage, 325, Avenue Hassan II, Agadir, Morocco.
3. Division of Ecology and Evolutionary Biology, University of Glasgow, Glasgow, Scotland G12 8QQ; Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Campus Agrário de Vairão, Rua Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão, Portugal.
4. Unité de Génétique et écophysiologie de la qualité des agrumes, INRA San Giuliano, F-20230 France.
5. Laboratoire d'Agroforestrie, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université Ibnou Zohr, BP 28S, Agadir, Morocco
6. Laboratoire de Biochimie, Environnement et Agroalimentaire, UFR Environnement et Santé, Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia, B.P.146, 20800 Mohammedia, Morocco
7. Unité de Recherche: Amélioration génétique des espèces à multiplication végétative, CIRAD TA A-75/02 Avenue Agropolis, 34398 Montpellier cedex 5 – France

Corresponding author:

Yann Froelicher

Unité de Recherche Multiplication végétative, CIRAD

F-20230 San Giuliano

France

Tel : +33 495595911

Email: froelicher@cirad.fr

ABSTRACT

Artificial tetraploid somatic hybrids have been developed for sterile triploid citrus breeding by sexual hybridization between diploid and tetraploid somatic hybrids. The genetic structure of diploid gametes produced by tetraploid genotypes depends on the mode of chromosome association at meiosis. In order to evaluate tetraploid inheritance in a tetraploid interspecific somatic hybrid between mandarin and lemon, we performed segregation studies using cytogenetic and SSR molecular markers. Cytogenetic analysis of meiosis in the somatic hybrid revealed 11% tetravalents and 76% bivalents. Inheritance of the tetraploid hybrid was analyzed by genotyping the triploid progeny derived from a cross between a diploid pummelo and the tetraploid somatic hybrid, in order to derive genotypes of the meiospores produced by the tetraploid. A likelihood-based approach was used to distinguish between disomic, tetrasomic, and intermediate inheritance models and to estimate the double reduction rate. In agreement with expectations based the cytogenetic data, marker segregation was largely compatible with tetrasomic and inheritance intermediate between disomic and tetrasomic, with some evidence for preferential pairing of homoeologs chromosomes. This has important implications for the design of breeding programs that involve tetraploid hybrids, and underscores the need to consider inheritance models that are intermediate between disomic and tetrasomic.

Keywords: *Citrus*, Somatic hybridization, tetraploid, meiotic configuration, intermediate inheritance, SSR markers

INTRODUCTION

Polyplodization is an important step in the evolution of many flowering plants (Adams and Wendel 2005; Otto and Whitton 2000; Soltis, et al. 2004; Soltis and Soltis 2000). New reproductively isolated plant taxa can arise almost instantaneously through genome duplication. Most crop plants have an allopolyploid history (Udall and Wendel 2006) and originated from hybridization between divergent species or lineages. The allopolyploid genome consists of two sets of homoeologous chromosomes (one derived from each ancestral lineage). At the meiotic level, this results in bivalent pairing configurations in which chromosomes from one ancestral lineage only pair with their homologs from the same ancestral lineage (Ramsey and Schemske 2002; Soltis and Soltis 1993; Sybenga 1996; Udall, et al. 2005). This gives no opportunities for recombination between the diverged genomes, and in particular, allelic combinations will never be transmitted to offspring (i.e., inheritance is disomic). As a result, progeny will display fixed heterozygosity at any locus that was polymorphic between the ancestral lineages. This may be useful for breeders, as it means that crops can be true-bred for hybrid traits.

If polyploids originate from hybridization between lineages that are not divergent enough to result in strict preferential pairing, pairing between divergent homoeologs is possible. This gives opportunities for intergenomic recombination. Depending on the degree of preferential pairing, specific allelic combinations may be underrepresented, but unless some are not viable, all possible allelic combinations will be transmitted to the offspring (i.e. inheritance is not disomic, but intermediate between disomic and polysomic). This may be useful for breeders, as recombination and transgressive segregation may produce novel phenotypes (Rieseberg, et al. 1999) that can be selected and possibly true-bred in subsequent generations. Due to its effects on the segregation of variation, knowing the exact mode of inheritance is of great importance in this context. Nevertheless, segregation studies only rarely consider inheritance models other than the extremes of strict disomic and strict tetrasomic inheritance, despite evidence that inheritance intermediate between disomic and polysomic could be widespread, especially in polyploids with a complex history of hybridization (Jannoo, et al. 2004; Stift, et al. 2008).

In this study, we explored if intermediate inheritance may apply to Citrus tetraploid hybrids. This would not be surprising, since hybridization within the mostly diploid ($2n=18$) *Citrus* genus is easy and results in viable hybrids. In fact, all diploid cultivated Citrus species derive from four diploid taxa (*C. reticulata*, *C. maxima*, *C. medica* and *C. micrantha*) (Barkley, et al. 2006; Bayer, et al. 2009; Froelicher, et al. 2010; Nicolosi, et al. 2000). Interest in tetraploid

Citrus breeds was sparked by the strategy to develop seedless triploid cultivars by crossing diploids and tetraploids (Esen and Soost 1972; Ollitrault, et al. 2008). There are only few naturally occurring candidates for such crossing (e.g. *Fortunella hindsii* (Esen and Soost 1972; Longley 1925)) but somatic tetraploid hybrids can be readily generated by protoplast fusion and are widely used in citrus breeding (Grosser, et al. 2000; Ollitrault, et al. 2008). Such interspecific somatic hybrids displayed univalent and multivalent pairing (Chen, et al. 2004; Del Bosco, et al. 1999) indicating that inheritance may not be disomic, but this has actually not been tested in any of the tetraploid Citrus hybrids. Our aim was to improve our understanding of the meiotic processes in Citrus tetraploids of somatic hybrid origin by combining cytological analysis with analyses of single sequence repeat markers (SSR) segregation. We used the interspecific tetraploid somatic hybrid between diploid *Citrus reticulata* Blanco (mandarin) and diploid *Citrus limon* (L.) Burm. (lemon) as a model. This somatic hybrid was obtained by Ollitrault et al. (2000b) and genetically characterized (Bassene, et al. 2009a; Gancel, et al. 2003), and the inheritance of the parents' phenotypes and transcriptome was also described (Bassene, et al. 2009a; Bassene, et al. 2009b; Gancel, et al. 2003). *Citrus reticulata* is an ancestral taxon and *Citrus limon* is a hybrid between *C. medica* and *C. aurantium* (itself a hybrid between *C. reticulata* x *C. maxima*) (Nicolosi, et al. 2000). Hence our tetraploid somatic hybrid genome is a mosaic comprising elements of three different ancestral genomes. A better understanding of its meiosis is important for the design of efficient breeding strategies for seedless triploid varieties (Ollitrault, et al. 2008), for example to improve or maintain fruit quality (Bassene, et al. 2009a; Bassene, et al. 2009b; Gancel, et al. 2003). We combined cytological analysis of meiotic configurations and segregation analysis using molecular markers. We applied a likelihood-based approach (Stift, et al. 2008) to evaluate whether disomic intermediate or tetrasomic inheritance best fitted the segregation of genetic markers in this Citrus interspecific somatic hybrid. In the case of non-tetrasomic inheritance, we analyzed the implication of chromosome preferential pairing in the restitution of parental and interspecific heterozygosity.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

A fertile tetraploid somatic hybrid ($2n = 4x = 36$) was previously obtained by protoplast fusion between the diploid ($2n=2x=18$) *Citrus reticulata* Blanco (Willowleaf mandarin SRA 133), hereafter referred to as WLM, and the diploid ($2n=2x=18$) *Citrus limon* (L.) Burm. (Eureka lemon SRA 4), hereafter referred to as EUR (Ollitrault, et al. 2000b). To investigate

the meiotic segregation of this somatic tetraploid hybrid (hereafter referred to as WLM+EUR), we generated a progeny of 114 triploids by pollinating diploid ($2n=2x=18$) *Citrus maxima* (Burm.) Merr. (Chandler SRA 608 pummelo), hereafter referred to as CHA, with pollen of the tetraploid somatic hybrid. The diploid maternal parent CHA was chosen because it is a non-apomictic cultivar that is strongly genetically differentiated from both WLM and EUR (Barkley, et al. 2006). Crosses were performed at the San Giuliano Research Station (Corsica, France) and seeds were cultivated *in vitro* in MT medium (Murashige and Tucker 1969) with addition of 30 g l⁻¹ sucrose and 1 mg l⁻¹ GA3 as described in Ollitrault et al. (1996). The plantlets obtained were grafted on *C. limonia* Osbeck (Volkameriana).

Determination of ploidy level

Ploidy level was determined by flow cytometry and confirmed by chromosome counts. Approximately 0.5 cm² of a plantlet leaf was chopped with 0.5 cm² of Citrus *C. madurensis* (2x) as control in 250 µl of a nuclei extraction buffer (Partec Cystain UV PreciseP). The solution obtained was filtered (pore size 30 µm) to eliminate cell debris. After filtration, 800 µl of staining buffer (Partec, Cystain UV Precise P Staining Buffer) was added for DNA staining. The sample was analyzed with UV excitation in a Partec flow cytometer (PA-I; Partec, Munster, Germany). For chromosome counts, young leaves were taken from plants cultivated in pots. They were treated in 0.04% hydroxyquinoline for 4 hours at room temperature, then fixed for 48 hours in 3:1 ethanol: acetic acid and stored at 4 °C in 70% ethanol. Chromosomes were prepared as described in D'Hont et al. (1996), then counterstained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) and observed under a Nikon Eclipse 80i microscope.

Meiotic analysis

For cytological analysis, flower buds were harvested at an early developmental stage (3-4 mm). The buds were fixed in 3:1 ethanol: acetic acid for 24 hours, washed twice with 70% ethanol and stored at 4 °C until use. Cytological preparations were made using the squash technique and aceto-carmin stain (Belling 1926; Li, et al. 2007).

DNA extraction

DNA was extracted from leaves using a modified mixed alkyl trimethyl ammonium bromide (MATAB) procedure (Gawel and Jarret 1991). The concentration of DNA was determined

using Hoechst 33258 (Sigma Chemical Co.) protocol (Sambrook and Russell 2006). Samples were diluted with MQ sterile water and stored at -20 °C until use.

SSR amplification

A total of 17 genomic SSR markers (Froelicher, et al. 2008; Ollitrault, et al. 2010) were selected for their polymorphism between the parents of the somatic hybrid and the seed parent CHA.

PCR reactions were performed in a total volume of 20 µl with 1x Taq buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.8U Taq DNA polymerase, 10 ng template DNA, 0.2 mM dNTPs, 0.4 µM forward primer and 0.4 µM reverse primer. Amplifications were performed in a MWG AG Primus 96 Plus thermocycler with 40 PCR cycles (94 °C for 5 min, 94 °C for 30 s, primer temperature 50 or 55 °C for 1 min, 72 °C for 45 s then 72 °C for 4 min). The fragments obtained were resolved on a 7 M urea 5% denaturing polyacrylamide gel 33 x 42 cm run at a constant power of 60 W. Gels were then silver stained using a method derived from the procedure of (Beidler, et al. 1982), alleles were determined according to a size marker (10 bp, Invitrogen) with the bio-gene version 97 software (Vilber Lourmat).

Data analysis

Based on the genotypes of the progeny of the test-cross between the diploid CHA and the tetraploid somatic hybrid, we deduced the allelic constitution of the gamete produced by the somatic hybrid. Subsequently, we used a parameter estimation procedure based on the constrained non-linear regression (CNLR) function implemented in SPSS 15.0 (SPSS syntax file available from <http://www.genetics.org/cgi/content/full/genetics.107.085027/DC1>) to estimate τ , i.e. the proportion of gametes that could be explained by random tetrasomic segregation (Stift, et al. 2008). This was done for each scenario of preferential pairing. This procedure simultaneously estimates β , i.e. the double reduction frequency relative to τ (Stift, et al. 2008). We then used a likelihood ratio test evaluated against a compound distribution of $\frac{1}{2} \chi^2_0 + \frac{1}{2} \chi^2_1$ (Self and Liang 1987) to evaluate if the estimated τ explained the data better than a model of strict tetrasomic segregation ($\tau=1$). For loci at which the somatic hybrid (WLM+EUR) had less than four alleles, we considered all possible scenarios for its allelic constitution, and chose the most likely constitution based on allele frequencies in the triploid progenies. We also considered the possibility of null alleles. For example, for markers with three different alleles (abc), we evaluated which of the constitutions, aabc, abbc, abcc or abc0, was the most likely given the observed allele frequencies. Similarly, for markers with two

alleles (ab) we used the allelic frequencies to establish which of the constitutions, aabb, aaab, abbb, aab0, abb0 or ab00, was the most likely. To improve our understanding of the nature of null alleles and to check if loci with null alleles could still be used to analyze segregation, we genotyped EUR, its ancestral taxa *C. medica* and *C. aurantium*, and a mixture of the latter.

RESULTS

Cytogenetic analysis

The meiotic chromosome behavior was mostly regular, and bivalents were predominant (76%, Table 1). Univalents (Figure 1 a) and tetravalents (Figure 1b and 1c) were found at a relatively low frequency (8% and 11%, Table 1); trivalents (Figure 1 ad) and hexavalents were even rarer (4% and 1%, Table 1). Laggard chromosomes were observed at anaphase and telophase I at very low levels (Figure 1 e). In some daughter cells, chromosome repartitioning at anaphase was unequal leading to abnormal tetrads, called polyads. These structures had a different number of microcytes (4 or 5) (Figure 1f).

Ploidy evaluation of the progeny

A total of 114 plantlets were obtained after germination. Flow cytometry and chromosome counts indicated that all of these plantlets were triploids (Figure 2).

SSR marker suitability and analysis of null alleles

17 SSR markers (Table 2) were consistently amplified and sufficiently differentiated (no more than one allele shared between WLM and EUR, unique alleles for CHA). For these loci, we deduced the allelic constitution of the 2n gamete produced by the somatic tetraploid hybrid by genotyping the triploid progeny. However, at 10 of the 17 SSR loci, segregation patterns deviated from Mendelian ratios and were consistent with the presence of null alleles. Indeed, significant allelic deviations from the Mendelian segregation ratios were observed at all 10 loci. Under the hypothesis of a null allele in EUR, all segregation ratios for the 10 loci tested showed no significant difference ($P \geq 0.05$) between observed and expected allelic ratios in the progeny (Table 3). Indeed, of the 17 loci, seven displayed no null alleles (mCrCIR08A03, Ci06A05b, mCrCIR02D04a, mCrCIR01F04a, CiBE5055, CiBE6147 and CiBE1098). At the remaining 10 loci, null alleles were suspected (Table 3). These null alleles were traced back to the EUR genome (a hybrid between *C. medica* and *C. aurantium* (Nicolosi, et al. 2000)). Mixtures of equals amounts (10 ng) of *C. medica* and *C. aurantium* DNAs showed

preferential amplification of *C. aurantium* alleles at loci Ci01H05, mCrCIR02D04b, mCrCIR04E02, mCrCIR06B07, mCrCIR07F11, and Ci07G07 (Table 4), which means that null alleles in the somatic WLM+EUR hybrid can be assumed to represent *C. medica* alleles. Preferential amplification of *C. medica* alleles was observed at loci mCrCIR02H08a, mCrCIRBE32I09 and mCrCIRBE9B23 (Table 4), and, at these loci, null alleles in the somatic WLM+EUR hybrid can be assumed to represent *C. aurantium* alleles. Finally, null alleles at locus mCrCIR07B05 could not be attributed to either species.

Marker segregation

For the seven loci at which no null alleles were observed, strict disomic inheritance was not observed, and the estimated degree of random Mendelian segregation (τ) varied from 0.53-0.95 (Table 5). For five of these loci (Ci06A05b, mCrCIR04F04a, CiBE5055, CiBE6147 and CiBE1098), the fit of intermediate models with the estimated parameter value for τ was not significantly better than the null model of full tetrasomic inheritance ($\tau=1$) (Table 5). In two cases (loci mCrCIR08A03 and mCrCIR02D04a), the estimated τ of 0.53 and 0.63 (respectively) provided a significantly better fit with the data than the full tetrasomic null model. Thus, their deviance G increased asymptotically when approaching full disomic inheritance $\tau=0$, reached minimum before strongly increasing again, when the value of τ tended to 1 (Figure 3). Notably, at locus mCrCIR08A03, preferential pairing involved chromosomes that originated from different parental species (i.e. pairing between homoeologs) while at locus mCrCIR02D04a, preferential pairing involved chromosomes from the same parental species (i.e. pairing between homologs). No double reduction gametes were detected in any of these markers.

For the 10 remaining markers in which null alleles had previously been identified, strict disomic inheritance was not observed, and the estimated degree of random Mendelian segregation (τ) varied from 0.24 and 0.87. For four of these loci (Ci01H05, mCrCIR07F11, mCrCIR02D04b and mCrCIRBE9B23), the fit of intermediate models with the estimated parameter value for τ was not significantly better than the null model of full tetrasomic inheritance ($\tau=1$) (Table 5 and 6). In fact, the likelihood of intermediate models at these loci decreased upon approaching $\tau=0$ (deviance G increased), flattened out around the minimum, and increased slightly near to $\tau=1$ (Figure 4). In six cases (loci mCrCIR04E02, mCrCIR06B07, mCrCIR02H08a, Ci07G07, mCrCIRBE32I09 and mCrCIR07B05), the estimated values of the τ parameter provided a significantly better fit than the full tetrasomic

null model at the loci (Table 6). In each of these cases, preferential pairing involved chromosomes from different ancestral species (i.e. pairing between homoeologs).

At three loci, mCrCIR01F04a, mCrCIR02D04a and CiBE5055, the somatic hybrid had four different alleles, making it possible to estimate the double reduction parameter α . No double reduction gametes were detected at these loci. At loci where the somatic hybrid showed common alleles without null alleles, no double reduction gametes, sharing the non common alleles, were observed. For the other loci, the identification of double reduction gametes was prevented by null alleles.

Thus, diploid gametes from WLM+EUR transmitted both intra and interparental heterozygosity when inheritance was tetrasomic or intermediate. Intraparental transmission rates ranged from 11% to 35%. Transmission rates of heterozygosity depended on the chromosome pairing mode. At loci where inheritance was intermediate, chromosome pairing mostly occurred between homeologous chromosomes. In this case, intraparental heterozygosity increased with a decrease in the value of τ , while in the case of preferential pairing between chromosomes of the same parent, intraparental heterozygosity decreased with a decrease in the value of τ (Table 5 and 6).

DISCUSSION

At all 17 loci studied, strict disomic inheritance hypothesis could be rejected due to the presence of allelic combinations that were incompatible with complete preferential pairing between homologs. At the other extreme, completely random segregation (i.e. tetrasomic inheritance) could be rejected in eight of the 17 cases.

Multivalent formation observed at meiosis in our somatic hybrid is in agreement with previously described phylogenetic results and the wide sexual compatibility observed in the *Citrus* genus (Cameron and Frost 1968). Indeed, the formation of multivalents in somatic hybrids could indicate a high homology between the parent genomes, as observed in sunflower (Binsfeld, et al. 2001), potato (Conicella, et al. 1997) and tomato (Gavrilenko, et al. 2001). In other interspecific *Citrus* tetraploid somatic hybrids, similar chromosome behavior, such as the formation of multivalents, has been observed in Hamlin orange + Rough lemon and Key lime + Valencia orange somatic hybrids (Chen, et al. 2004) and in the Femminello lemon + Valencia sweet orange somatic hybrid (Del Bosco, et al. 1999). The meiotic configurations observed in the WLM+EUR hybrid indicated a degree of homology between the two parent genomes, implying pairing between chromosomes derived from these two different species (called “homeologous”). In this case, the chromosome behavior of our

somatic hybrid could be due to the closer relatedness and high homology between the fusion parents. Univalents were also observed at low frequency (8%) in the somatic hybrid. Generally, these structures remain as lagging chromosomes and do not migrate during anaphase I, leading to the formation of polyads. Similar results have been observed in many *Citrus* interspecific somatic hybrids (Chen, et al. 2004; Del Bosco, et al. 1999). Meiotic analysis provided evidence of a relatively low percentage of tetravalents (11%). This is compatible with the observed rates of double reduction gametes and leads to the prediction that inheritance may not be completely disomic.

The meiotic behavior of this somatic hybrid provided some but not sufficient information to distinguish between the different modes of inheritance. To elucidate this aspect, genetic analyses were performed on the progeny by using 17 SSR markers. Among these markers, the existence of null alleles was inferred from allelic segregation. Significant deviations from Mendelian allelic segregation were observed at 10 of the loci when considering absence of null alleles. However, all these loci fit expected Mendelian ratios when accounting for the presence of null alleles. This hypothesis was confirmed by the analysis of the putative parents of lemon (*C. aurantium* and *C. medica*) and DNA mix of its putative parents indicating PCR competition between alleles of the lemon parents. This result is important for the use of these markers in segregation studies. Indeed null alleles make heterozygous diploids appear homozygous and can lead to biased estimations in genetic studies in populations (Oddou-Muratorio, et al. 2009). These null alleles could be due to differential amplification of size variant alleles (allelic competition) (Wattier, et al. 1998) or to less specificity. Alleles in the same species could differ from the reference sequence (Jarne and Lagoda 1996) leading to poor primer annealing and thus, less efficient amplification using the original PCR primers (Dakin and Avise 2004). The markers used were defined in Cleopatra mandarin (*C. reticulata*) and clementine (*C. reticulata* x *C. sinensis*) (Froelicher, et al. 2008; Ollitrault, et al. 2010) and *C. medica* and *C. maxima*, which contributed to the genesis of lemon, are known to show marked differentiation from *C. reticulata* (Barkley, et al. 2006; Nicolosi, et al. 2000). SSR markers facilitated the determination of gamete genotypes at the 17 loci studied in the case of our cross. The random combination of parental alleles in gametes did not support the hypothesis of disomic inheritance for our interspecific *Citrus* somatic hybrid. Indeed, many observed gamete genotypes were not expected under disomic inheritance. Using the seven SSR markers without null alleles, a likelihood approach was used to estimate if any preferential pairing was evident. The use of the constrained non-linear regression function made it possible to distinguish between disomic tetrasomic and intermediate inheritance (Stift,

et al. 2008). The results obtained revealed a tetrasomic and intermediate inheritance in this Citrus interspecific somatic hybrid. Assessment of the preferential pairing involved in intermediate inheritance was possible. In our somatic hybrid, preferential pairing concerned chromosomes that derived from the two different parental species at seven loci, while it was between homologous chromosomes at only one locus.

Preferential pairing between homeologous chromosomes and the formation of multivalents in our somatic hybrid could be the consequence of intergenomic homology between mandarin and lemon resulting from the interspecific origin of lemon. As mentioned above, lemon is a complex tri interspecific hybrid associating *C. medica*, *C. reticulata* and *C. maxima* fragments that have experienced few interspecific meiotic events. It can be assumed that from the haploid complement inherited from *C. aurantium*, some lemon chromosomes are mainly of *C. reticulata* origin and others of *C. maxima* origin with implication in preferential chromosome pairing. Similar results were found in sunflower (Binsfeld, et al. 2001), in *Brassica* polyploids (Nicolas, et al. 2008). Meiotic pairing in allotetraploids is not constantly preferential and could thus lead to meiotic recombinations between homeologous chromosomes (Sybenga 1996). Such configurations can homogenize the genome and induce a shift in the inheritance mode from a disomic to a tetrasomic model (Stift, et al. 2008). Moreover, in a dihaploid population obtained from an interspecific somatic hybrid of *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*, Barone et al. (2002) observed tetrasomic inheritance. Like the *Citrus* species we used in this study, the two *Solanum* species are sexually compatible at the diploid level, so the apparent lack of preferential pairing in the *Solanum* somatic hybrid may suggest that intergenomic recombination has already homogenized the hybrid genome.

Tetraploid somatic hybrids can produce highly heterozygous gametes. Under tetrasomic inheritance without double reduction, diploid gametes should transmit 33% of intraparental heterozygosity and 66% of interparental heterozygosity to triploid progeny. Under disomic inheritance, only interspecific heterozygosity will be transmitted. When inheritance is intermediate, transmission of intraparental or interparental heterozygosity depends on the type of chromosome pairing. Indeed, if the preferential pairing involves parental chromosomes, transmission of intraparental heterozygosity will decrease in the progeny from 33% to 0%, with decreasing values of τ . Conversely, if preferential chromosome pairing preferentially involves chromosomes of the two different parents, transmission of intraparental heterozygosity will increase from 33% to 50% with decreasing values of τ .

In our interspecific somatic hybrid, both intra and interparental heterozygosity were transmitted. Their rate of transmission depended on the rate of random chromosome pairing gametes, in agreement with previous theoretical assertions.

Knowledge of the mode of inheritance of somatic hybrids is necessary to predict the offspring in interploid crosses, and certainly has important implications for linkage mapping and population genetics and thus for breeding programs involving tetraploid parents.

This is the first study reporting this mode of tetraploid inheritance in an interspecific *Citrus* somatic hybrid using molecular markers. Our results provide evidence in favor of tetrasomic and intermediate inheritance for this *Citrus* interspecific somatic hybrid. Thus *Citrus* tetraploid somatic hybrids also offer possibilities for the inheritance and segregation of useful characters from both fusion parents. It is very probable that somatic hybrids between genetically closer parents such as mandarin + orange or mandarin + mandarin will exhibit the same inheritance behavior. This knowledge is important for developing and implementing appropriate strategies for breeding seedless triploid Citrus.

Tetraploid genotypes should play a significant role in the evolution of future cultivated forms as genitors in interploid crosses. In the near future, ploidy manipulation associated with new breeding strategies to develop seedless triploid fruits should lead to a change of the cultivated citrus coming from diploid to polyploid.

Acknowledgement We thank the “*Domaines Abbès Kabbage*”, Agadir (Morocco) and the “*Comité Mixte Inter Universitaire Franco-Marocain*” (Programme Volubils, MA/08/196) for the grant assigned to Mourad Kamiri. This study was supported by the “*Collectivité Territoriale de Corse*” (CTC).

REFERENCES

1. Adams KL, Wendel JF (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8:135-141
2. Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT (2006) Assessing genetic diversity and population structure in a *citrus* germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 112:1519-1531
3. Barone A, Li J, Sebastiano A, Cardi T, Frusciante L (2002) Evidence for tetrasomic inheritance in a tetraploid *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrid through the use of molecular markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 104:539-546
4. Bassene JB, Berti L, Costantino G, Carcouet E, Kamiri M, Tomi F, Dambier D, Ollitrault P, Froelicher Y (2009a) Inheritance of characters involved in fruit quality in a citrus interspecific allotetraploid somatic hybrid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:5065-5070
5. Bassene JB, Froelicher Y, Dhuique-Mayer C, Mouhaya W, Ferrer RM, Ancillo G, Morillon R, Navarro L, Ollitrault P (2009b) Non-additive phenotypic and transcriptomic inheritance in a citrus allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* and *C. limon*: the case of pulp carotenoid biosynthesis pathway. *Plant Cell Reports* 28:1689-1697
6. Bayer RJ, Mabberley DJ, Morton C, Miller CH, Sharma IK, Pfeil BE, Rich S, Hitchcock R, Sykes S (2009) A molecular phylogeny of the orange subfamily (*Rutaceae: Aurantioideae*) using nine cpDNA sequences. *Journal of Botany* 96:668-685
7. Beidler JL, Hilliard PR, Rill RL (1982) Ultrasensitive Staining of Nucleic-Acids with Silver. *Analytical Biochemistry* 126:374-380
8. Belling J (1926) The iron-acetocarmine method of fixing and staining chromosomes. *The Biological Bulletin* 50:160-162
9. Binsfeld PC, Wingender R, Schnabl H (2001) Cytogenetic analysis of interspecific sunflower hybrids and molecular evaluation of their progeny. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 102:1280-1285
10. Cameron JW, Frost HB (1968) Genetics, breeding, and nucellar embryony. In: REUTHER, W, BATCHELOR, LD & WEBBER, HJ, eds *The citrus industry*, University of California - Division of Agricultural Science 2:325-370
11. Chen CL, Guo WW, Yi HL, Deng XX (2004) Cytogenetic analysis of two interspecific *Citrus* allotetraploid somatic hybrids and their diploid fusion parents. *Plant Breeding* 123:332-337

12. Conicella C, Genuardo G, Lucia R, Ramulu KS, Cardi T (1997) Early tapetal degeneration and meiotic defects are involved in the male sterility of *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrids. TAG Theoretical and Applied Genetics 95:609-617
13. D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, Rao S, Berding N, Glaszmann JC (1996) Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. Molecular and General Genetics 250:405-413
14. Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. Heredity 93:504-509
15. Del Bosco SF, Tusa N, Conicella C (1999) Microsporogenesis in a *Citrus* interspecific tetraploid somatic hybrid and its fusion parents. Heredity 83:373-377
16. Esen A, Soost RK (1972) Tetraploid progenies from 2x X 4x crosses of Citrus and their origin. Journal of the American Society for Horticultural Science 97:410-414
17. Froelicher Y, Dambier D, Bassene JB, Costantino G, Lotfy S, Didout C, Beaumont V, Brottier P, Risterucci AM, Luro F, Ollitrault P (2008) Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). Molecular Ecology Resources 8:119-122
18. Froelicher Y, Mouhaya W, Bassene JB, Costantino G, Kamiri M, Luro F, Morillon R, Ollitrault P (2010) New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal *citrus* phylogeny. Tree Genetics & Genomes DOI: 10.1007/s11295-11010-10314-x
19. Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM (2003) Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:6006-6013
20. Gavrilenko T, Thieme R, Rokka VM (2001) Cytogenetic analysis of *Lycopersicon esculentum* (+) *Solanum tuberosum* somatic hybrids and their androgenetic regenerants. TAG Theoretical and Applied Genetics 103:231-239
21. Gawel NJ, Jarret RL (1991) A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. Plant Mol Biol 9:374-380
22. Grosser JW, Ollitrault P, Olivares-Fuster O (2000) Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 36:434-439

23. Jannoo N, Grivet L, David J, D'Hont A, Glaszmann JC (2004) Differential chromosome pairing affinities at meiosis in polyploid sugarcane revealed by molecular markers. *Heredity* 93:460-467
24. Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11:424-429
25. Li J, Harper LC, Golubovskaya I, Wang CR, Weber D, Meeley RB, McElver J, Bowen B, Cande WZ, Schnable PS (2007) Functional Analysis of Maize RAD51 in Meiosis and Double-Strand Break Repair. *Genetics* 176:1469-1482
26. Longley AE (1925) Polycary, polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 15:347-351
27. Murashige T, Tucker DPH (1969) Growth factor requirements of tissue culture. *Proc First Intl Citrus Symp* 3:1155-1161
28. Nicolas SD, Leflon M, Liu Z, Eber F, Chelysheva L, Coriton O, Chèvre AM, Jenczewski E (2008) Chromosome 'speed dating' during meiosis of polyploid *Brassica* hybrids and haploids. *Cytogenetic and Genome Research* 120:331-338
29. Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, Malfa SI, Continella G, Tribulato E (2000) *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 100:1155-1166
30. Oddou-Muratorio S, Vendramin G, Buiteveld J, Fady B (2009) Population estimators or progeny tests: what is the best method to assess null allele frequencies at SSR loci? *Conservation Genetics* 10:1343-1347
31. Ollitrault F, Terol J, Pina JA, Navarro L, Talon M, Ollitrault P (2010) Development of SSRs markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BACend sequences and interspecific transferability in *Citrus*. *American Journal of Botany* DOI 10.3732/ajb.1000280
32. Ollitrault P, Dambier D, Allent V, Luro F, Jacquemond C (1996) *In vitro* rescue and selection of spontaneous triploids by flow cytometry for easy peeler *Citrus* breeding
33. Proceedings of the Eighth International Citrus congress International Society of Citriculture, Sun City, South Africa 2:913-917
34. Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Carreel F, D'Hont A, Luro F, Bruyere S, Cabasson C, Lotfy S, Joumaa A, Vanel F, Maddi F, Treanton K, Grisoni M (2000b) Somatic hybridisation potential for *Citrus* germplasm utilization. *Cahiers Agricultures* 9:223-236
35. Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Froelicher Y (2008) Ploidy manipulation for breeding seedless triploid *citrus*. *Plant Breeding Reviews* 30:323-352

36. Otto SP, Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu Rev Genet* 34:401-437
37. Ramsey J, Schemske D (2002) Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:589-639
38. Rieseberg LH, Archer MA, Wayne RK (1999) Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* 83:363-372
39. Sambrook J, Russell DW (2006) Fluorometric Quantitation of DNA Using Hoechst 33258. *Analytical biochemistry* 2006:pdb.prot4458-
40. Self SG, Liang KY (1987) Asymptotic properties of maximum likelihood estimators and likelihood ratio tests under nonstandard conditions. *Journal of the American Statistical Association* 82:605-610
41. Soltis DE, Soltis PS (1993) Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences* 12:243-273
42. Soltis DE, Soltis PS, Tate JA (2004) Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist* 161:173-191
43. Soltis PS, Soltis DE (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:7051-7057
44. Stift M, Berenos C, Kuperus P, Van Tienderen P (2008) Segregation Models for Disomic, Tetrasomic and Intermediate Inheritance in Tetraploids: A General Procedure Applied to *Rorippa* (Yellow Cress) Microsatellite Data. *Genetics* 179:2113-2123
45. Sybenga J (1996) Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids: do segmental allopolyploids exist? *Genome* 39:1176-1184
46. Udall JA, Quijada PA, Osborn TC (2005) Detection of chromosomal rearrangements derived from homeologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. *Genetics* 169:967-979
47. Udall JA, Wendel JF (2006) Polyploidy and Crop Improvement. *Crop Science* 46:3-14
48. Wattier R, Engel RC, Saumitou-Laprade P, Valero M (1998) Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* 7:1569-1573

Figure Captions

Figure 1: Microsporogenesis in the tetraploid Willow Leaf mandarin+ Eureka lemon somatic hybrid. (a) Chromosome pairing showing univalent (I) and trivalent (III); (b) (c) Tetravalent (arrow); (d) heptavalent and trivalent; (e) laggard chromosome at metaphase I; (f) Abnormal tetrad showing five microcytes.

Figure 2: Mitotic chromosome counts from young leaf preparation of a progeny sample of CHA x WLM+EUR genotype (3x). 27 chromosomes are counterstained with DAPI.

Figure 3: Deviance (fit) of 3 observed SSR loci (with no null alleles) segregation in Willow Leaf mandarin+ Eureka lemon somatic hybrid to inheritance models ranging from $\tau=0$ (full disomic) to $\tau=1$ (full tetrasomic).

Figure 4: Deviance (fit) of 3 observed SSR loci (with null alleles) segregation in Willow Leaf mandarin+ Eureka lemon somatic hybrid to inheritance models ranging from $\tau=0$ (full disomic) to $\tau=1$ (full tetrasomic).

Table 1 Chromosome configuration at meiosis in microsporocytes of Willow Leaf mandarin+Eureka lemon somatic hybrid

| Samples | Plate position | I | II | III | IV | V | VI | Total chromosomes |
|---------|--------------------------------|------|-------|------|-----|----|------|-------------------|
| 1 | 38,73/17,80 | 4 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 36 |
| 2 | 38,97/17,94 | 6 | 11 | 0 | 2 | 0 | 0 | 36 |
| 3 | 37,85/16,53 | 2 | 15 | 0 | 1 | 0 | 0 | 36 |
| 4 | 37,68/16,45 | 5 | 8 | 1 | 3 | 0 | 0 | 36 |
| 5 | 36,92/16,93 | 4 | 14 | 0 | 1 | 0 | 0 | 36 |
| 6 | 36,48/16,35 | 2 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 36 |
| 7 | 36,60/16,78 | 3 | 15 | 1 | 0 | 0 | 0 | 36 |
| 8 | 35,18/9,78 | 2 | 15 | 0 | 1 | 0 | 0 | 36 |
| 9 | 33,19/14,82 | 1 | 14 | 1 | 1 | 0 | 0 | 36 |
| 10 | 33,06/16,96 | 1 | 16 | 1 | 0 | 0 | 0 | 36 |
| 11 | 33,22/16,92 | 10 | 9 | 0 | 2 | 0 | 0 | 36 |
| 12 | 33,30/16,70 | 0 | 16 | 0 | 1 | 0 | 0 | 36 |
| 13 | 33,14/16,34 | 3 | 15 | 1 | 0 | 0 | 0 | 36 |
| 14 | 33,09/16,28 | 2 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 36 |
| 15 | 33,02/15,17 | 2 | 10 | 0 | 2 | 0 | 1 | 36 |
| 16 | 33,06/17,06 | 2 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 36 |
| 17 | 33,10/14,61 | 2 | 8 | 2 | 3 | 0 | 0 | 36 |
| 18 | 37,80/16,48 | 0 | 16 | 0 | 1 | 0 | 0 | 36 |
| 19 | 35,59/9,90 | 5 | 12 | 1 | 1 | 0 | 0 | 36 |
| | Mean value | 2,94 | 13,73 | 0,42 | 1 | 0 | 0,05 | |
| | Number of included chromosomes | 2,94 | 27,47 | 1,26 | 4 | 0 | 0,31 | |
| | % | 8% | 76% | 4% | 11% | 0% | 1% | |

I, II, III, IV, V, VI: univalent, divalent, trivalent, quadrivalent, pentavalent, hexavalent.

Table 2 Characteristics of selected SSR markers used for Willow Leaf mandarin+ Eureka lemon somatic hybrid allelic inheritance study.

| locus | EMBL or Genebank Accession no. | Primer sequence (5'–3') | Tm (°C) |
|------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------|
| mCrCIR08A03 * | AM489753 | F : GTGAAAGAGAGCAAGAAAAAT R : AGCCAAAAAGAGAAGAAATG | 55 |
| Ci01H05 * | AJ567401 | F : AAACAACCAAAAAGGACAAGATT R : TTCAAACATAACAAACCAACTCG | 55 |
| Ci06A05b * | AJ567407 | F : TCTCTGGTTGGTTTTTGTGA R : ATGATGAAAAGCAAGGGG | 50 |
| mCrCIR01F04a * | AM489736 | F : AAGCATTTAGGGAGGGTCACT R : TGCTGCTGCTGTTGTTGTTCT | 55 |
| mCrCIR02D04a*** | FR677564 | F : GTGATGATGATGGTGATG R : CCAACAAACACAATTCC | 50 |
| mCrCIR04E02*** | FR677566 | F : GAAGGTGTTCTGGTGATG R : CGATAGAAAACAGGATGG | 55 |
| mCrCIR06B07 * | AM489745 | F : CGGAACAATAAAACAAT R : TGGGCTTGTAGACAGTTA | 50 |
| mCrCIR07F11*** | FR677567 | F : ACTATGATTACTTTGCTTTGAG R : GAAGAAACAAGAAAAAAAAT | 50 |
| mCrCIR07B05 * | AM489747 | F : TTTGTCTTTTTTGGTCTTTT: R : CTTTCTTTTCTAGTTTCCC | 50 |
| mCrCIR02H08a*** | FR677565 | F : GCACCATTGCCTTCT R : CATCAACGATCAACATTC | 50 |
| mCrCIR02D04b*** | FR677564 | F : CTCTCTTTCCCCATTAGA R : AGCAAACCCCACAAC | 50 |
| Ci07G07 * | AJ567413 | F : TCAACAAAACCATTACAT R : AGTCTTTCACGTTAATCAC | 50 |
| CiBE1098** | ET075973 | F : GGTGGCATAACATACATACATA R : GCAACATCTGGAAGTACTCA | 55 |
| CiBE6147** | ET085226 | F : GCCTGTGGTTCATCTCTATCT R : AAGTGGGATTTGGTGATTT | 55 |
| CiBE5055** | ET111355 | F : AACAGTGGTCTGGAAGAAATAG R : GGTGGTCTCAAAGTCATCATC | 55 |
| mCrCIRBE9B23*** | ET074207 | F : CCAAATGAAACTCTCCACAA R : CTCAAACAGTGAATAAACCAAA | 55 |
| mCrCIRBE32I09*** | ET094358 | F : AGGCTAATGGAATGACCAA R : AGACAATACAATGAAGGCAAA | 55 |

* published in (Froelicher et al. 2008)

** published in (Ollitrault et al. accepted)

*** published in this paper

Table 3 Distribution of expected genotypes in the CHA X WLM+EUR progeny at the 17 studied loci. For ten of these loci allelic distortion, have been observed and were resolved by considering null alleles in EUR. Allelic distortion was evaluated under two assumptions: Presence or absence using Chi square test. Corresponding P values for EUR with and without null allele are given

| locus | Parental genotypes | | | Diploid gametes observed genotypes | | | | | | P value | |
|--------------|--------------------|----------|-----------------|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------|-------|
| | WLM | EUR | WLM+EUR | | | | | | | Allelic distortion tests | |
| | | | | EUR (XX) | EUR (X0) | | | | | | |
| mCrCIR08A03 | AA | BC | AABC | AA 21 | AB 38 | AC 29 | BC 26 | | | 0,563 | - |
| Ci01H05 | AA | BB or B0 | AABB or AAB0 | AA 57 | AB 41 | B0 or BB 16 | | | | 0 | 0,128 |
| Ci06A05b | AA | BC | AABC | AA 15 | AB 36 | AC 47 | BC 16 | | | 0,583 | - |
| mCrCIR01F04a | AB | CD | ABCD | AB 21 | AC 18 | AD 19 | BC 16 | BD 21 | CD 19 | 0,943 | - |
| mCrCIR04E02 | AA | BB or B0 | AABB or AAB0 | AA 51 | AB 37 | B0 or BB 26 | | | | 0,001 | 0,559 |
| mCrCIR06B07 | AA | BB or B0 | AABB or AAB0 | AA 44 | AB 47 | B0 or BB 23 | | | | 0,005 | 0,064 |
| mCrCIR07F11 | AB | CC or C0 | ABCC or ABC0 | AB 12 | AC 20 | BC 24 | AA or A0 23 | BB or B0 12 | CC or C0 23 | 0,001 | 0,353 |
| mCrCIR02D04a | AB | CD | ABCD | AB 11 | AC 26 | AD 21 | BC 18 | BD 25 | CD 13 | 0,95 | - |
| mCrCIR02D04b | AB | CC or C0 | ABCC or ABC0 | AB 7 | AC 18 | BC 25 | AA or A0 19 | BB or B0 22 | CC or C0 23 | 0,002 | 0,593 |
| mCrCIR07B05 | AB | AA or A0 | AAAB or AAB0 | AB 38 | AA or A0 56 | B0 or BB 20 | | | | 0,001 | 0,368 |
| mCrCIR02H08a | AA | BB or B0 | AABB or AAB0 | AA or A0 53 | AB 35 | B0 or BB 26 | | | | 0 | 0,727 |

Résultats et discussion – Etude de la ségrégation allélique chez un hybride somatique interspécifique

| | | | | | | | | | | | |
|---------------|----|----------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|-------|
| Ci07G07 | AA | B0 | AABB or AAB0 | AA or A0 50 | AB 39 | B0 or BB 25 | | | | 0,001 | 0,423 |
| CiBE1098 | AA | BB | AABB | AA 27 | AB 68 | BB 19 | | | | 0,289 | - |
| CiBE6147 | AA | BC | AABC | AA 23 | AB 45 | AC 33 | BC 13 | | | 0,221 | - |
| mCrCIRBE9B23 | A0 | B0 | AB00 | AB 22 | AA or A0 36 | BB or B0 36 | "00" 20 | | | - | 0,966 |
| mCrCIRBE32I09 | AB | CC or C0 | ABCC or ABC0 | AB 13 | AC 13 | BC 28 | AA or A0 18 | BB or B0 16 | CC or C0 26 | 0,011 | 0,181 |
| CiBE5055 | AB | CD | ABCD | AB 14 | AC 20 | AD 16 | BC 30 | BD 15 | CD 19 | 0,165 | - |

WLM : *Citrus reticulata* cv Willowleaf mandarin

EUR : *Citrus limon* cv Eureka lemon

WLM+EUR : *Citrus reticulata* cv Willowleaf mandarin + *Citrus limon* cv Eureka lemon somatic hybrid

CHA : *Citrus maxima* cv Chandler pummelo

A, B, C, D: allele length (A represents the longest allele)

0: null allele

Table 4 Genetic characterization of Eureka lemon (*C. limon*) and its presumed parents *C. aurantium*, *C. medica* and a DNA mixture with equal amounts of *C. aurantium*, *C. medica* DNAs using distorted SSR markers

| SSR markers | <i>C. limon</i> | <i>C. aurantium</i> | <i>C. medica</i> | DNA Mix |
|---------------|-----------------|---------------------|------------------|---------|
| Ci01H05 | B | B | A | B |
| mCrCIR02D04b | B | AB | 0 | AB |
| mCrCIR02H08a | B | A | B | AB |
| mCrCIR04E02 | A | A | B | A |
| mCrCIR06B07 | C | BC | A | BC |
| mCrCIR07B05 | B | AB | B | AB |
| mCrCIR07F11 | D | CD | AB | CD |
| Ci07G07 | A | A | B | A |
| mCrCIRBE9B23 | B | A | B | A |
| mCrCIRBE32I09 | B | A | B | A |

Table 5 Fitting inheritance model and rates of intraparental and interparental heterozygosity on segregation of 7 SSR loci with no null alleles in CHA x WLM+EUR triploid progeny.

| WLM | EUR | SSR | Pref Pairing | Best intermediate model | | | | % Heterozygosity | |
|-----|-----|--------------|--------------|-------------------------|------|------|---------|------------------|---------------|
| | | | | Betatau | Tau | LRT | P value | Intraparental | Interparental |
| AA | BC | mCrCIR08A03 | AB/AC | - | 0,53 | 3,08 | 0,040 | 23% | 59% |
| AA | BC | Ci06A05b | AA/BC | - | 0,79 | 2,62 | 0,053 | 14% | 73% |
| AB | CD | Ci02D04a | AB/CD | - | 0,63 | 8,29 | 0,002 | 21% | 79% |
| AB | CD | mCrCIR01F04a | AD/BC | - | 0,92 | 0,36 | 0,274 | 35% | 65% |
| AB | CD | CiBE5055 | AD/BC | - | 0,92 | 0,36 | 0,274 | 29% | 71% |
| AA | BB | CiBE1098 | AB/AB | - | 0,58 | 2,43 | 0,059 | ## | 60% |
| AA | BC | CiBE6147 | AA/BC | - | 0,95 | 0,16 | 0,345 | 11% | 68% |

Comparison of fit has been made between tetrasomic null model and the best fitting intermediate model. LRT values were evaluated as described in Materials and methods and are significant at the indicative level.

WLM : *Citrus reticulata* cv Willowleaf mandarin

EUR : *Citrus limon* cv Eureka lemon

WLM+EUR : *Citrus reticulata* cv Willowleaf mandarin + *Citrus limon* cv Eureka lemon somatic hybrid

CHA : *Citrus maxima* cv Chandler pummelo

A, B, C, D: allele length (A represents the longest allele)

Table 6 Fitting inheritance model and rates of intraparental and interparental heterozygosity on segregation of 10 SSR loci with null alleles in CHA x WLM+EUR triploid progeny.

| WLM | EUR | SSR | Pref Pairing | Best intermediate model | | | | % Heterozygosity | |
|-----|-----|---------------|-----------------|-------------------------|------|------|------------|------------------|---------------|
| | | | | Betatau | Tau | LRT | P value | Intraparental | Interparental |
| AA | B0 | Ci01H05 | AB/A0 | - | 0,66 | 1,62 | 0,101 | 14% | 61% |
| AA | B0 | Ci04E02 | AB/A0 | - | 0,29 | 6,79 | 0,005 | 23% | 55% |
| AA | B0 | mCrCIR06B07 | AB/A0 | - | 0,55 | 2,74 | 0,049 | 20% | 61% |
| AA | B0 | Ci02H08a | AB/A0 | - | 0,24 | 7,80 | 0,003 | 23% | 54% |
| AA | B0 | Ci07G07 | AB/A0 | - | 0,37 | 5,40 | 0,010 | 22% | 56% |
| AB | C0 | Ci07F11 | AC/B0 | - | 0,84 | 1,10 | 0,147 | 31% | 69% |
| AB | C0 | Ci02D04b | AB/C0 | 0,083 | 0,87 | 1,03 | 0,155 | 26% | 65% |
| AB | C0 | mCrCIRBE32I09 | AC/B0 | - | 0,76 | 3,34 | 0,034 | 34% | 66% |
| A0 | B0 | mCrCIRBE9B23 | AB/00 | - | 0,79 | 0,62 | 0,215 | - | - |
| AB | A0 | mCrCIR07B05 | AA/B0 | - | 0,47 | 3,78 | 0,026 | - | - |

Comparison of fit has been made between tetrasomic null model and the best fitting intermediate model. LRT values were evaluated as described in Materials and methods and are significant at the indicative level.

WLM : *Citrus reticulata* cv Willowleaf mandarin

EUR : *Citrus limon* cv Eureka lemon

WLM+EUR : *Citrus reticulata* cv Willowleaf mandarin + *Citrus limon* cv Eureka lemon somatic hybrid

CHA : *Citrus maxima* cv Chandler pummelo

A, B, C, D: allele length (A represents the longest allele)

0: null allele

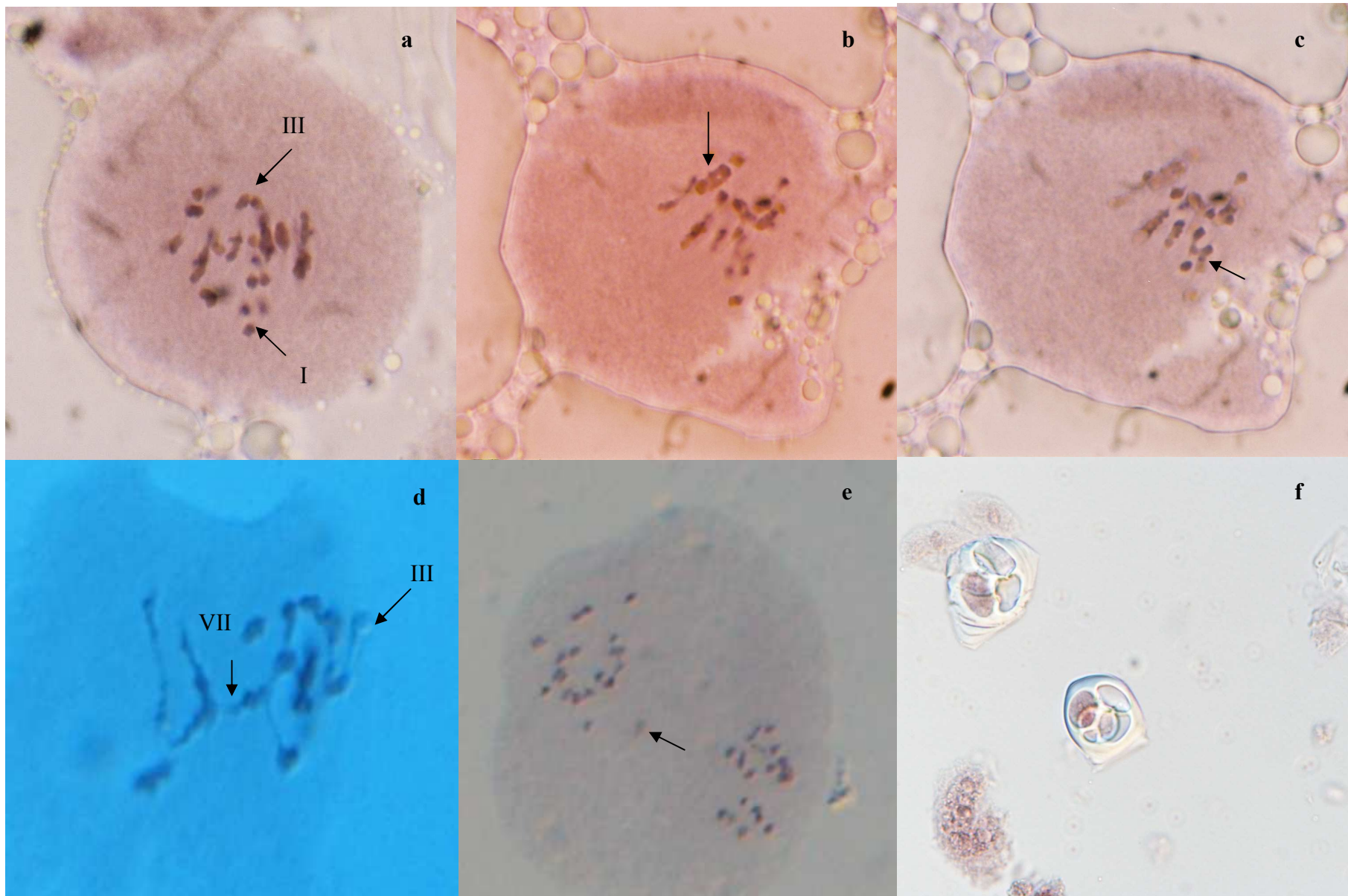


Figure 1

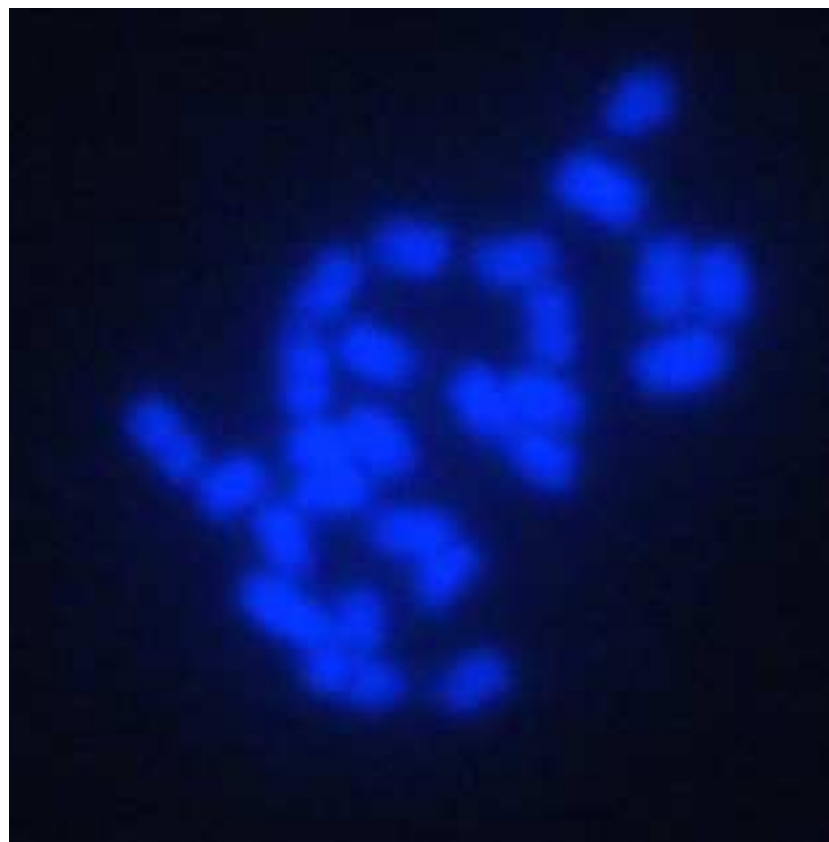


Figure 2

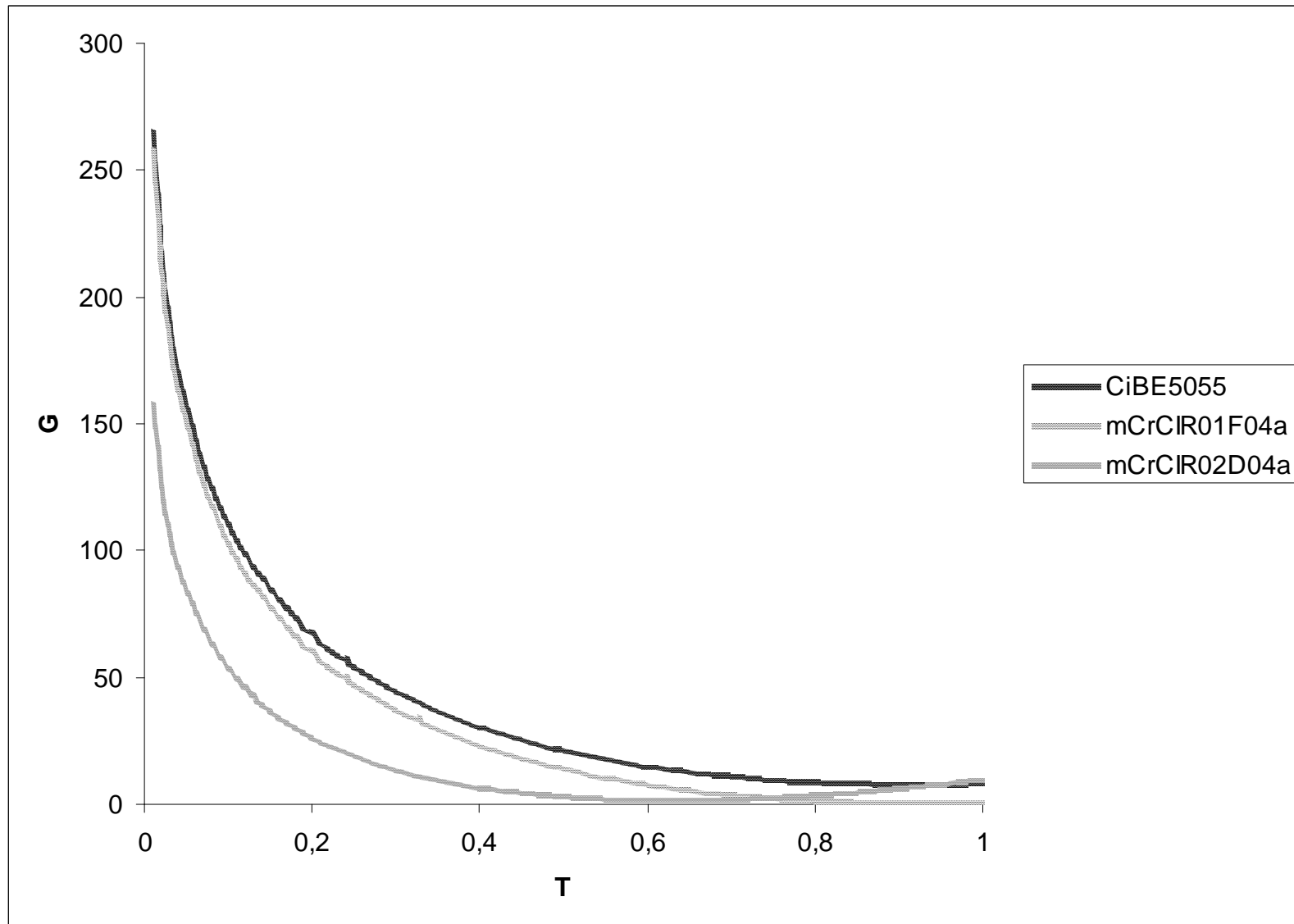


Figure 3

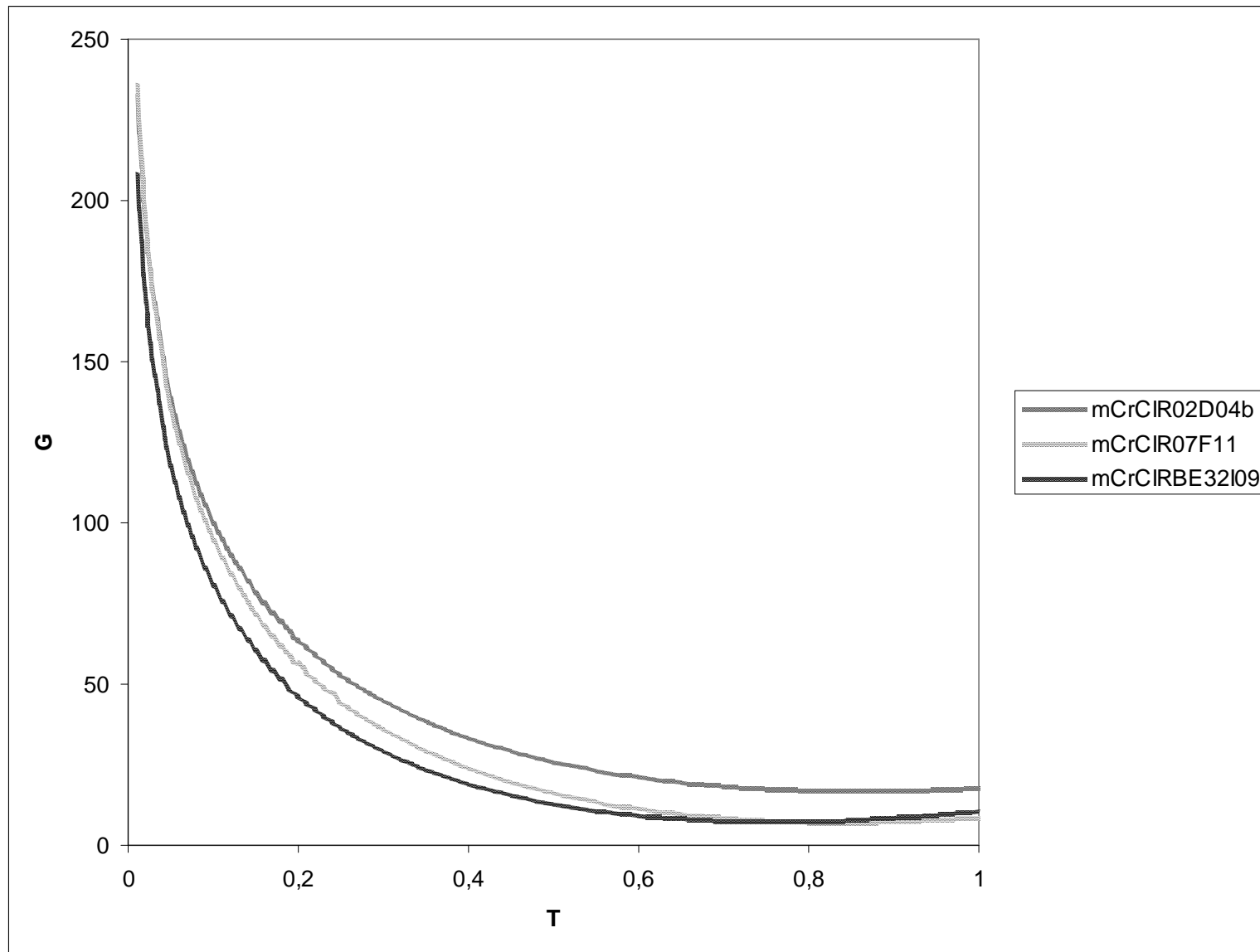


Figure 4

IV.4 ETUDE DE LA SEGREGATION ALLELIQUE CHEZ UN HYBRIDE SOMATIQUE INTERGENERIQUE ENTRE *CITRUS RETICULATA* ET *PONCIRUS TRIFOLIATA*

IV.4.1 Résumé de l'article

Introduction

La production du bassin méditerranéen, basée sur les petits fruits type clémentine et mandarine, représente à elle seule 20% de la production mondiale. Cependant la culture d'agrumes dans cette zone fait face à des pressions biotiques et abiotiques grandissantes qui accompagnent le changement climatique global et la mondialisation des échanges (le déficit hydrique, la salinité, l'alcalinité des sols calcaires, la tristeza, les nématodes, le mal secco et le Phytophthora).

Plusieurs espèces du genre *Citrus* et genres apparentés se distinguent par leurs tolérances vis-à-vis de contraintes biotiques ou abiotiques. L'exploitation de cette diversité génétique au niveau intergénérique, par recombinaison génétique, se trouve souvent limitée par la complexité de la biologie de la reproduction des agrumes. L'hybridation somatique représente une alternative de choix pour exploiter la diversité génétique des agrumes et cumuler intérêt agronomique et tolérance biotique et abiotique. En effet, cette technique peut être utilisée dans le cadre d'amélioration de porte-greffe d'agrumes, en produisant des hybrides tétraploïdes combinant les propriétés de parents diploïdes incompatibles ou difficiles à hybrider possédant des caractères d'intérêt. Ces caractères peuvent ensuite être exploités dans des schémas de sélection conventionnels au niveau tétraploïde. Cela permet d'offrir la possibilité de recombinaison allélique entre différents parents et de maximiser la diversité génétique dans la descendance zygotique de ces hybrides somatiques.

Afin d'optimiser ces schémas de sélection, il semble essentiel d'avoir une compréhension claire du mode de formation des gamètes produits par ces hybrides somatiques au niveau intergénérique. L'objectif de ce travail est d'évaluer le mode de ségrégation allélique chez un hybride somatique intergénérique d'agrumes entre mandarinier Willowleaf (*Citrus reticulata*) et Poncirus Pomeroy (*Poncirus trifoliata*) (WLM+PON) présentant d'intéressantes perspectives en tant que porte-greffe. Pour ce faire, l'analyse moléculaire d'une population triploïde, générée par un croisement entre l'hybride somatique et des fleurs de

pamplemoussier Chandler (*C. maxima*), a été effectuée à l'aide de marqueurs moléculaires polymorphes distribués sur les neuf groupes de liaison de la carte génétique de la clémentine.

Matériels et méthodes

Le croisement entre le pamplemoussier Chandler et l'hybride somatique Willowleaf + Poncirus Pomeroy (WLM+PON) a été réalisé au printemps 2006. Les pépins récoltés ont été sauvés *in vitro* et la ploïdie des plantules a été évaluée par comptage chromosomique et cytométrie en flux. 19 marqueurs SSR polymorphes, répartis sur les différents groupes de liaisons de la carte génétique de la clémentine, ont été sélectionnés pour l'étude de la ségrégation allélique chez cet hybride somatique intergénérique.

Résultats et discussion

Après germination, 58 plants ont été obtenus et se sont révélés triploïdes. 19 marqueurs polymorphes ont été retenus pour l'étude de la ségrégation. Les résultats de la caractérisation moléculaire des individus triploïdes issus du croisement CHA X WLM+PON montrent une ségrégation intermédiaire, plus proche d'une ségrégation disomique que d'une ségrégation tétrasomique au niveau de 16 des 19 différents loci étudiés. Une forte distorsion allélique est observée sur les trois loci manquants empêchant l'étude de la ségrégation au niveau de ces derniers. L'appariement chromosomique préférentiel chez cet hybride somatique se produit entre chromosomes homologues sur les différents loci étudiés. Cette ségrégation intermédiaire favorise la transmission de l'hétérozygotie interparentale au dépend de l'intraparentale. Ces résultats pourraient être dus à une homologie, variable d'un groupe de liaison à l'autre, entre WLM et PON parents diploïdes de l'hybride somatique intergénérique. En effet, les taxonomistes ont décrit ces espèces sur des données morphologiques et non sur des données génétiques.

IV.4.2 Article

Titre : Gametic configuration and inheritance of SSR markers in tetraploid intergeneric *Citrus reticulata* + *Poncirus trifoliata* somatic hybrid; evidence for preferential homologous pairing

**Mourad Kamiri, Marc Stift, Ikbal Srairi, Gilles Costantino, Patrick Ollitrault et
Yann Froelicher**

BMC genetics. Article soumis

Mourad Kamiri^{1, 2}, Marc Stift³, Ikbal Srairi², Gilles Costantino⁴, Patrick Ollitrault⁵ and Yann Froelicher¹

Gametic configuration and inheritance of SSR markers in tetraploid intergeneric *Citrus reticulata* + *Poncirus trifoliata* somatic hybrid; evidence for preferential homologous pairing

1. Unité de Recherche Multiplication végétative, CIRAD San Giuliano, F-20230 France.

2. Domaines Abbes Kabbage, 325, Avenue Hassan II, Agadir, Morocco.

3. Division of Ecology and Evolutionary Biology, University of Glasgow, Glasgow, Scotland G12 8QQ; Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Campus Agrário de Vairão, Rua Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão, Portugal.

4. Unité de Génétique et écophysiologie de la qualité des agrumes, INRA San Giuliano, F-20230 France.

5. Unité de Recherche: Amélioration génétique des espèces à multiplication végétative, CIRAD TA A-75/02 Avenue Agropolis, 34398 Montpellier cedex 5 – France.

Corresponding author:

Patrick Ollitrault

Unité de Recherche: Amélioration génétique des espèces à multiplication végétative, CIRAD TA A-75/02 Avenue Agropolis, 34398 Montpellier cedex 5 – France

Tel : 0034963424019

ABSTRACT

Genetic structure of diploid gametes produced by tetraploid genotypes depends on the chromosome pairing mode at meiosis and it is generally admitted that tetrasomic inheritance occur for autotetraploid and disomic segregation for allotetraploid. Intergeneric sexual breeding between *Citrus* and *Poncirus* at tetraploid level is a promising new avenue for citrus rootstock. To assess the meiotic behaviour of intergeneric allotetraploid genotype between *Citrus* and *Poncirus* we have studied the inheritance mode of SSR markers in triploid progenies obtained by pollinating *Citrus maxima* (Burm.) Merr ($2n=2x=18$) cv “Chandler” with a tetraploid *Citrus reticulata* Blanco cv “Willowleaf” + *Poncirus trifoliata* (L.) Raf somatic hybrid. 19 polymorphic markers have been selected to study inheritance. A likelihood-based approach able to incorporate disomic, tetrasomic, and intermediate inheritance models was used to identify the inheritance model that best fits on observed results. Moreover, this approach helped to estimate the double-reduction rate. Obtained results support intermediate inheritance in a *Citrus* intergeneric somatic hybrid with occurrence of preferential pairing of homologous chromosomes. The rate of preferential pairing is variable between linkage groups, from 0.09 to 0.50, leading to an average of 91% of interparental heterozygosity restitution. Double reduction genotypes were observed in some loci and their frequencies were very low. The implication of this inheritance mode for tetraploid rootstock breeding is discussed.

Keywords: *Citrus*, Somatic hybridization, tetraploid, disomic, tetrasomic, intermediate inheritance, SSR markers

INTRODUCTION

Polyploidy provided a significant pathway for plant evolution. Thence, several studies suggest that around 70 % of flowering plants are issued from polyploids [1-3].

Polyploids can occur from chromosome doubling due to a disruption in mitosis or from the union of unreduced gametes that haven't gone through normal meiosis [4, 5]. Polypleidy can also be induced artificially in cell culture by some chemicals or somatic hybridization.

Polyploids are classified as either autotetraploids originated by polyploidization events within a single species or allopolyploids derived from the chromosome combination of distinct genomes [6, 7]. In nature, this distinction is not clear cut and is influenced by taxonomic partitioning of natural variation. Allotetraploid species present two sets of homeologous chromosomes [8] and are typically associated with disomic inheritance [2, 9]. Segregation is similar to diploids because only homologous chromosomes derived from the same diploid ancestor pair at meiosis, so that there are no opportunities for interspecific recombination. Therefore, disomic inheritance is exclusively associated with a bivalent meiotic configuration. In contrast, in autopolyploids all four chromosomes are homologous and may pair in any combination, bivalents, trivalents or quadrivalents. Hence, all chromosome copies have the opportunity to recombine and inheritance is polysomic [10, 11], as observed in tetraploid gynodioecious *Thymus praecox* [12] or in tetraploid *Allium nevii* [13]. Segregation of these autopolyploids is characterized by the production of all possible allelic combinations in equal frequencies [9].

Allo and autotetraploids (with disomic and tetrasomic inheritance, respectively) are the extremes of a range. In cases where parents are divergent but have retained enough homology to prevent exclusive preferential pairing, inheritance patterns intermediate between di- and tetrasomic can be expected [14]. Many polyploid taxa display a combination of autopolyploid and allopolyploid pairing behaviour [15-17] and several studies presented inheritance patterns intermediate to disomic and tetrasomic [18-20]. In these cases, there is no complete homologous pairing over homeologous. The rate of preferentially homologous chromosome pairing depends on the different degrees of evolutionary and taxonomic affiliation of the involved genomes [14]. Most of the inheritance mode studies concerned only the two extreme segregations. Data analyses were realized using Khi 2 and Bayesian tests to evaluate whether segregation was disomic or polysomic in polyploids [21-24]. Recently, Stift et al. [14] proposed a likelihood-based approach to evaluate whether disomic intermediate or tetrasomic inheritances best fitted the segregation of genetic markers.

Cultivated *Citrus* species derive from four diploid ($2n=2x=18$) taxa (*C. reticulata*, *C. maxima*, *C. medica* and *C. micrantha*) [25-28]. “True citrus” [29] includes five genus, *Fortunella*, *Poncirus*, *Microcitrus*, *Eremocitrus*, *Glymenia* in addition to *Citrus*. These genus are more or less sexually compatible. However, molecular phylogenic studies indicated that the *Citrus* genus is distant from the related genera *Poncirus*, *Microcitrus* and *Eremocitrus* [26]. *Poncirus* is also phenotypically quite different from *Citrus*. *Poncirus* is the only genus to be deciduous with trifoliate leaves. It presents interesting traits such cold hardiness, tolerances to *Phytophthora* species and nematodes and *Citrus tristeza virus* (CTV) resistance. However it is very susceptible to salinity and iron chlorosis associated with calcareous and high pH soils. *Poncirus* is therefore an important citrus rootstock in areas without salt or high pH. The main objective of citrus rootstock breeding programs is to combine tolerance traits to biotic (mostly CTV and *Phytophthora*) and abiotic stress (alkalinity/salinity/drought). Some interesting sexual hybrid rootstocks were obtained but progress of citrus genetic improvement by conventional sexual breeding is still limited, mainly due to the reproductive biology and heterozygosity of genitors [25, 30, 31]. This heterozygosity leads to important trait segregation in progenies, thus dramatically reducing the probability of obtaining recombinant first generation hybrids cumulating all the desirable genes and traits of the two parents. Conversely somatic hybridization is very promising for citrus rootstock breeding [32-36]. Indeed it allows the accumulation of all genes related to biotic and abiotic tolerance of the two parents, irrespective to their heterozygosity level. Somatic hybridization has been widely used in Florida by IFAS [32, 37]. Besides creating new rootstocks directly by somatic hybridization, a new strategy to breed tetraploid rootstock by the so-called “Tetrazyg” strategy was developed [32]. Conventional sexual breeding at the tetraploid level was performed using selected allotetraploid somatic hybrid rootstocks as parents. This provides the opportunity to recombine alleles from three or four proven diploid rootstocks and to maximize the genetic diversity in zygotic progeny, particularly if the tetraploid parents display tetrasomic meiotic behavior. To optimize such breeding scheme it appears essential to have a clear understanding of the inheritance mode of the gametes produced by allotetraploid parents.

The aim of the present work was to investigate the mode of inheritance, disomic, tetrasomic or intermediate in a citrus intergeneric somatic hybrid between “Willowleaf” mandarin *Citrus reticulata* and “Pomeroy” *Poncirus trifoliata* (WLM+PON) previously obtained by Ollitrault et al. [38] and presenting interesting behavior as rootstock [39]. Fifty eight triploid hybrids were obtained by pollinating the diploid “Chandler” pummelo *Citrus maxima* with the

tetraploid WLM+PONC. Gamete genetic structures were inferred from triploid progeny genotypes. We applied a likelihood-based approach [14] to evaluate whether disomic intermediate or tetrasomic inheritances best fitted the segregation of genetic markers in this intergeneric somatic hybrid. In case of non tetrasomic inheritance we have analyzed the implication of chromosome preferential pairing on the restitution of parental and interspecific heterozygosity. This is the first study reporting markers segregations data in intergeneric somatic hybrid in true Citrus.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

A fertile tetraploid ($2n=4x=36$) intergeneric citrus somatic hybrid was previously obtained by protoplast fusion between “Willowleaf” mandarin SRA 133 (*C. reticulata* Blanco) (WLM) ($2n=2x=18$) and “Pomeroy” *Poncirus* (*P. trifoliata*) (L.) (PON) ($2n=2x=18$). A progeny of 58 triploid hybrids obtained by pollinating flowers of *Citrus maxima* (Burm.) Merr ($2n=2x=18$) cv “Chandler” (CHA) by pollen issued from our somatic hybrid. Chandler was chosen because it’s a non apomictic cultivar with strong genetic differentiation with mandarin cv “Willowleaf” and *Poncirus* “Pomeroy”. Crosses were performed at the San Giuliano Research Station (Corsica, France). Fruits were collected at maturity and seeds were recovered, then cultivated *in vitro* in MT medium [40] with addition of 30 g l^{-1} sucrose and 1 mg l^{-1} GA3 [41]. Obtained plantlets were grafted on volkameriana (*C. limonia* Osbeck).

Flow cytometric analysis

Ploidy level was determined by flow cytometry and confirmed by chromosome counts. Approximately 0.5 cm^2 of plantlet leave was chopped with a 0.5 cm^2 of *C. madurensis* ($2x$) as control in a $250 \text{ }\mu\text{l}$ of a nuclei extraction buffer (Partec Cystain UV PreciseP). The solution obtained was filtered (pore size of $30 \text{ }\mu\text{m}$) to eliminate cell debris. After filtration, $800 \text{ }\mu\text{l}$ of staining buffer (Partec, Cystain UV Precise P Staining Buffer) was added for DNA staining. The sample was analyzed with UV excitation in a Partec flow cytometer (PA-I; Partec, Munster, Germany). The sample was analyzed with UV excitation in a Partec flow cytometer (PA-I; Partec, Munster, Germany). Chromosome count was realized on young leaves, taken from plants cultivated in pots. After treatment in 0.04% hydroxyquinoline for 4 h at room temperature, the young leaves were fixed for 48h in 3:1 ethanol:acetic acid and stored at 4°C in 70% ethanol. Chromosome preparation was performed as described in (D'Hont, et al.

1996). The chromosomes were counterstained with DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) and were observed under a Nikon Eclipse 80i microscope.

DNA extraction

DNA was extracted from leaves using a modified mixed alkyl trimethyl ammonium bromide (MATAB) procedure [42]. The concentration of DNA was determined using Hoechst 33258 (Sigma Chemical Co.) protocol [43]. Samples were diluted with MQ sterile Water and stored at -20°C until use.

SSR amplification

A total of 195 genomic SSR [44-46], were tested using the parents of the somatic hybrid and the seed parent. Used markers, directly labeled by Wellred fluorochrome (PA-2(dye2), PA-3(dye3) or PA-4(dye4), Beckman-Coulter) were synthesized by Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com>).

PCR reactions were performed in 20 µl with 1x Taq buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.8U Taq DNA polymerase, 10 ng template DNA, 0.2 mM dNTPs, 0.4 µM forward primer and 0.4 µM reverse primer. Amplifications were performed, in MWG AG Primus 96 plus thermocycler, with 40 PCR cycles (94 °C for 5 min, 94 °C for 30 s, primer temperature (50 or 55 °C) for 1min, 72 °C for 45 s then 72 °C for 4 min). Fragment analysis and allele calling was done using the CEQ 8800 genetic analyzer and software, respectively (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Data analysis

Based on the genotypes of the progeny of the cross between the diploid CHA and the tetraploid somatic hybrid, we deduced the allelic constitution of the gamete produced by the somatic hybrid. Subsequently, we used a parameter estimation procedure based on the constrained non-linear regression (CNLR) function implemented in SPSS 15.0 (SPSS syntax file available from <http://www.genetics.org/cgi/content/full/genetics.107.085027/DC1>) to estimate τ - the proportion of gametes that could be explained by random tetrasomic segregation (Stift, et al. 2008). This was done for each scenario of preferential pairing. This procedure simultaneously estimates β - the double reduction frequency relative to τ (Stift, et al. 2008). We then used a likelihood ratio test evaluated against a compound distribution of $\frac{1}{2}\chi^2_{20} + \frac{1}{2}\chi^2_{21}$ (Self and Liang 1987) to evaluate if the estimated τ explained the data better than a model of strict tetrasomic segregation ($\tau=1$). For loci for which the somatic hybrid (WLM+PON) had less than four alleles, we considered all possible scenarios for its allelic

constitutions, and chose the most likely constitution based on allele frequencies in the triploid progenies. We also considered the possibility of null alleles. For example, for markers with three different alleles (abc) we evaluated which of the constitutions aabc, abbc, abcc or abc0 was most likely given the observed allele frequencies. Similarly, for markers with two alleles (ab) we used the allelic frequencies to establish which of the constitutions aabb, aaab, abbb, aab0, abb0 or ab00 was most likely.

Dissimilarities between gametes was estimated by the simple matching index using Darwin software [47].

$$d_{ij} = 1 - \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L \frac{m_l}{\pi}$$

Where d_{ij} : dissimilarity between units i and j; L : number of loci; π : ploidy and finally m_l : number of matching alleles for locus l

RESULTS

Ploidy level determination

After crosses, 63 full seeds were obtained from 41 fruits. Nevertheless, only 59 plantlets germinated after seed recovery in a growth chamber. Ploidy evaluation of the obtained plantlets showed that 58 plantlets were triploids and one tetraploid. Chromosome counting confirmed the flow cytometry results (**Figure 1**).

SSR marker selection and distortion analyzes

In order to genotype the obtained progeny, we selected 19 polymorphic SSR markers, localized in the nine linkage groups of the Clementine genetic map [48] (**Table 1**) that consistently amplified and presented a sufficient differentiation between the three parents. Indeed among all the primer pairs, many were not usable for inheritance model studying because of common alleles. The 19 primers selected had one or no allele in common between WLM and PON and possible common alleles between the somatic hybrid and the female parent CHA. Indeed, using capillary electrophoresis, we were able to use the MAC-PR method to estimate the allele copy number [12, 49]. These primers allowed inferring gametes genotypes from progeny genotypes making it possible to realize a likelihood based approach to identify the best fit inheritance model.

First, chi square goodness of fit test was realized at the allelic level for the 19 studied loci to verify the presence or absence of allelic distortions at these loci. No segregation distortion

was detected in 15 SSR markers without null allele hypothesis. At mCrCIR02F12 locus, allelic segregation ratio departed from the Mendelian ratio and was consistent with the presence of a null alleles in PON initially scored homozygous. After considering the presence of null allele in PON, segregation ratio for this locus showed no significant difference ($P \geq 0.05$) between observed and expected allelic ratios in the progeny.

At three others loci mCrCIR02D03, mCrCIR07C09 and mCrCIR03F05, allelic segregation ratios deviated significantly ($P < 0.05$) from the expected ratios. At these loci, allelic distortion was not resolved by presence of null alleles (**Table 2**). These loci with allelic distortion were excluded of the segregation mode analysis.

SSR segregation

Segregation mode was analyzed from the inferred diploid gamete structure. Using the constrained nonlinear regression function, the estimated values of τ (proportion of gametes formed by random meiotic chromosome associations) of the best intermediate inheritance models, at the 16 studied loci, were ranged between 0.07 and 0.58 (**Table 3**). At these loci, the fit of intermediate models showed a significantly better fit than the full tetrasomic inheritance null model (**Table 3**). The likelihood of intermediate model decreased near to $\tau=0$. Thus, their deviance G increased asymptotically when approaching full disomic inheritance $\tau=0$, reached its minimum before increasing highly again, when the value of τ tends to 1 (**Figure 2**).

mCrCIR02D04b, mCrCIR03D12a and mCrCIR07D06 are markers belonging to the same linkage group (4). Besides the same inheritance mode, preferential chromosome pairing involved homologous chromosomes with close proportions of gametes formed by random meiotic chromosome associations at these loci. The average value of τ for the markers of this linkage group is 0.28. The same similarity for locus appertaining to a same linkage group were observed at mCrCIR02D09, MEST46 (group 2; average $\tau=0.09$); CiBE5055, MEST 431 (group 1; average $\tau=0.50$); mCrCIR01F08a, mCrCIR07E12 (group 5; average $\tau=0.39$) and mCrCIR02A09, mCrCIR07B05, mCrCIR02G02 (group 8; average $\tau=0.15$). At the others loci, mCrCIR02G12, mCrCIR02F12, mCrCIR07E05 and mCrCIR02B07, located each in different linkage groups, preferential chromosome pairing was also between homologous chromosomes with a value of τ ranged between 0.21 and 0.38.

To summarize, at 16 SSR markers distributed on all nine linkage groups, disomic inheritance was rejected because of the presence of unexpected gamete genotypes. Tetrasomic inheritance was also rejected. Intermediate inheritance showed a better fit at all studied loci, involving

homologous chromosome pairing. The frequency of homologous preferential pairing varies between linkage groups.

Double reduction rate estimation

The allelic conformation allowed to analyze the double-reduction rate at 11 loci. Indeed for MEST 46, MEST 431, mCrCIR01F08a, mCrCIR07B05, and mCrCIR07E05 markers with double duplex conformation none of the double reduction gamete should be differenced from the others. For locus mCrCIR02F12 null allele prevented double reduction gametes identification.

Double reduction gametes have been identified for mCrCIR02D09, mCrCIR02G12, mCrCIR03D12a, mCrCIR02A09, and mCrCIR02B07. In all these loci, double reductions gametes were partially observed, because of common alleles and the estimated rates are given (Table 4).

No double reduction gametes were detected for locus mCrCIR02G02, CiBE5055, mCrCIR02D04b, mCrCIR07D06 and mCrCIR07E12.

Double reduction gametes in distorted markers were not considered.

Heterozygosity transmission and gamete diversity

Diploid gametes issued from this intergeneric somatic hybrid transmitted both intra and interparental heterozygosity. The rate of interparental heterozygosity transmission is directly linked with τ . Indeed, in loci where pairing was between homologous chromosome, interparentale heterozygosity transmission rates were ranged between 79% and 97% and decreased linearly with increasing values of τ (**Figure 3**).

When analyzing the individual gametic structures with the 16 locus allowing a complete differentiation of alleles from *Poncirus* and *Citrus*, we founded 4 diploid gametes with complete intergeneric heterozygosity transmission. The average intergeneric heterozygosity transmission was 90 % and the intrageneric one only 3%. The preferential pairing and consecutive predominant intergeneric heterozygosity transmission have for consequence that the gamete genetic diversity is mainly due to segregations of the parental intra-generic diversity. This is clearly shown by the distribution of dissimilarities between gametes of the allotetraploid (**Figure 4**). The dissimilarity average based on all alleles (0.291) is strongly higher of the dissimilarity average based only on intrageneric segregation (0.113).

DISCUSSION

Segregation distortion are frequent in citrus and should be reduced for diploid gametes

Deviations to Mendelian allelic segregation at only 3 of the studied loci, mCrCIR02D03, mCrCIR07C09 and mCrCIR03F05, were observed with significant chi square test. Abnormal segregation of markers has already been observed in *Citrus*, particularly in diploid crosses of individuals belonging to different genera [50-53]. They were particularly marked in the progeny of a diploid intergeneric hybrids between “Cleopatra” mandarin (*C. reticulata*) and *Poncirus trifoliata* [54], but are also found at intrageneric level and are generally much more important for the male parent than the female one [48, 55]. For species with vegetative propagation like citrus, unfavorable mutations can accumulate in heterozygous status without affecting the diploid plants but are revealed by further sexual mating particularly through the pollen competition. Beside recessive lethal or unfavorable factors, these distortions could be generated by gametic incompatibility genes, gametic competition, abortion of zygotes or gamete and preferential fertilization [52, 56]. It is very likely that these factors are less pregnant for highly heterozygous diploid gametes produced by allotetraploid hybrids than for haploid gametes produced by diploid parents. Inheritance study at these distorted loci was cancelled. Indeed, none of the models have a good fit with the data due to these observed distortions.

The intergeneric *C. reticulata* + *P. trifoliata* present intermediary segregation and preferential homologous chromosome pairing is variable among linkage groups:

Random tetrasomic segregation could be rejected as well as complete disomic inheritance in our intergeneric somatic hybrid. Among the 19 selected SSR, 16 SSR markers were retained for inheritance study. For all these loci, intermediate model provided a significant better fit than the null model of full tetrasomic inheritance with a preferential pairing occurring between chromosomes derived from the same parent. At these loci, the proportion of gametes formed by random meiotic chromosome association τ varied from 0.07 to 0.58.

Summarizing, in WLM+PON, intermediate inheritance is approved instead of full disomic inheritance as expected indicating relatively high homology between fusion parents genomes. However, homologous chromosomes paired more frequently than homeologous ones. The inheritance observed for a *Citrus* interspecific somatic hybrid between mandarin and lemon was also intermediate but with a tendency to tetrasomy [57]. Molecular phylogenetic studies based on nuclear [25, 28], chloroplast [26, 28] and mitochondrial [27] genome clearly

demonstrate that genetic distances are higher between the *Poncirus* genus and *Citrus* species than within the *Citrus* genus. A higher homology is thus expected between mandarin and lemon than between mandarin and *Poncirus* and it is logical that preferential pairing was less marked in the interspecific hybrid than the intergeneric one.

Intermediate inheritance in *Citrus* intergeneric somatic hybrid is in agreement with the sexual compatibility observed between *Citrus* and *Poncirus* [58] testifying of high homology at the intergeneric level. However preferential pairing between homologous chromosomes is clearly predominant in the allotetraploid hybrid. This result is in agreement with cytogenetic study realized in an intergeneric *Citrus* somatic hybrid between “Cleopatra” mandarin (*C. reticulata*) and “Argentine” *Poncirus* (*P. trifoliata*) (Chen, et al. 2004). A high percentage of bivalents was observed, in this tetraploid somatic hybrid, suggesting a low chromosome homology between the fusion parents. *Citrus* interspecific somatic hybrids showed univalents and multivalents formation during meiosis [57, 59, 60] and this cytogenetic observation was associated with preferential tetrasomic inheritance for the *C. reticulata* + *C. lemon* hybrid. However, meiotic behavior, only, is not sufficient for distinguishing between the two modes of inheritance. Multivalents can be observed only at the early stages of meiotic division and can remain undetected because they have already dissociated at the stages generally observed [61]. Moreover, bivalents formation do not necessary indicates pairing affinity and thus chromosome homology [11]. Indeed, tetrasomic inheritance was associated with exclusively bivalent pairing in *Lotus corniculatus* [16] and in colchicine-induced autotetraploid *Brassica oleracea* [62].

Our results suggest that preferential pairing is variable between linkage groups and therefore that the intergeneric genome divergence could be not identical for the different chromosomes. Similar observation of variability of preferential pairing revealed by different locus was made in second-generation of autotetraploid pacific oysters [63]. In sugar cane, Janno et al [64] demonstrated differential chromosome pairing affinities between the multiple homeologous chromosome copy of this highly polyploid crop.

Double reduction rates and heterozygosity transmission

In the obtained progeny, double reduction gametes have been observed in four loci. Indeed, tetraploids can undergo double reduction when multivalent are formed and a cross-over occurs between a locus and its centromere followed by adjacent segregation [65]. The maximum frequency of double reduction is 1/6 and can be reached if quadrivalents were always formed at meiosis [14]. Our progeny sample size is probably not enough for a rightful

estimation of double reduction rate in our somatic hybrid. Estimated double reduction rates were lower than their theoretical maximal value and were closer to the theoretical minimum (0) than to its maximum (1/6). The analyzed locus present a good dispersion in the Clementine genetic map [48] and we can assume that they are not all centromeric; thus these results are indicative of low tetravalents formation in the analyzed somatic hybrid.

Concerning the transmission of heterozygosity, tetraploid somatic hybrids can display high heterozygosity at gametic level. Under tetrasomic inheritance, produced diploid gametes, should transmit intraparental or interparental heterozygosity to triploid progeny [66, 67]. However, when there is a high differentiation between the two somatic hybrids parents, disomic inheritance will lead to only interspecific heterozygosity transmission. When inheritance is intermediate, transmission of intraparental or interparental heterozygosity is dependent on chromosome pairing mode and double reduction rates. For a same linkage group this last parameter will be higher for telomeric markers than centromeric ones thus heterozygosity transmission is slightly higher for centromeric loci than telomeric ones. If the preferential pairing involves homologous chromosomes, intraparental and interparental heterozygosity restitutions will respectively increase and decrease, with increasing values of τ . Conversely, if homeologous chromosomes pair preferentially, intraparental and interparental heterozygosity restitution will respectively decrease and increase with an increasing τ values as observed by Kamiri, et al [57] for an interspecific hybrid between mandarin and lemon. Thus, interparental heterozygosity restitution was much more higher in our intergeneric somatic hybrid (average 90%) than in the interspecific somatic hybrids studied by Kamiri et al [57].

Implications for breeding:

For perennial vegetatively propagated crops with a long juvenile phase, like citrus, breeding strategies are generally based on one cycle of variability induction (hybridization, mutagenesis, biotechnologies) followed by a selection/validation process and clonal propagation of elite genotypes. In order to improve the effectiveness of such strategies, it appears essential to optimize the transfer of the genetic gains obtained by phenotypic selection at the parental level. As citrus germplasm is generally highly heterozygous [25, 31], it is important to transmit parental heterozygosity to the progenies to prevent global breakage of the favorable complex multilocus genotypic structure selected at the parental level. We have shown that the differentiation between *C. reticulata* and *Poncirus trifoliata* genomes was sufficient to drive preferential homologous pairing and highly predominant intergeneric

heterozygosity transmission. Under such inheritance mode, most of the diversity of the progenies is based on initial intrageneric diversity given by the parent of the allotetraploid somatic hybrid. Thus if the parents of the allotetraploid are heterozygous for important traits important segregation should occur for these traits and the “Tetrazyg” strategy [32] should requires the optimization of multi-traits selection processes. At the opposite, if important dominant traits are homozygous for the parents of the intergeneric somatic hybrids they will be transmitted with high frequency to the progenies of the somatic hybrid. Beside inheritance of intergeneric somatic hybrids our results suggest that doubled diploid of intergeneric diploid sexual hybrids such as citrandarin (*C. reticulata* x *P. trifoliata*), citrange (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) or citrumello (*C. paradisis* x *P. trifoliata*) should produce gametes transferring a very important part of the genome of the initial diploid hybrid. Thus the phenotypic selection at the level of the diploid intergeneric parents should have a strong impact on the products of the “Tetrazyg” strategy.

LITTERATURE CITED

1. Adams KL, Wendel JF: **Polyploidy and genome evolution in plants**. *Current Opinion in Plant Biology* 2005, **8**(2):135-141.
2. Ramsey J, Schemske DW: **Neopolyploidy in flowering plants**. *Annual Review of Ecology and Systematics* 2002, **33**:589-639.
3. Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, dePamphilis CW, Wall PK, Soltis PS: **Polyploidy and angiosperm diversification**. *Journal of Botany* 2009, **96**(1):336-348.
4. Ramsey J, Schemske DW: **Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants**. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1998, **29**:467-501.
5. Soltis PS, Soltis DE: **The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(13):7051-7057
6. Barone A, Li J, Sebastiano A, Cardì T, Frusciante L: **Evidence for tetrasomic inheritance in a tetraploid *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrid through the use of molecular markers**. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 2002, **104**(4):539-546.
7. Udall JA, Wendel JF: **Polyploidy and Crop Improvement**. *Crop Science* 2006, **46**(Supplement_1):3-14.
8. Chenuil A, Galtier N, Berrebi P: **A test of the hypothesis of an autopolyploid vs. allopolyploid origin for a tetraploid lineage: application to the genus *Barbus* (Cyprinidae)**. *Heredity* 1999, **82**:373-380.
9. Soltis DE, Soltis PS: **Molecular data and the dynamic nature of polyploidy**. *Critical Reviews in Plant Sciences* 1993, **12**(4):243-273.
10. Sybenga J: **Preferential pairing estimates from multivalent frequencies in tetraploids**. *Genome* 1994, **37**(6):1045-1055.
11. Sybenga J: **Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids: do segmental allopolyploids exist?** *Genome* 1996, **39**(6):1176-1184.
12. Landergott U, Naciri Y, Schneller JJ, Holderegger R: **Allelic configuration and polysomic inheritance of highly variable microsatellites in tetraploid gynodioecious *Thymus praecox* agg.** *TAG Theoretical and Applied Genetics* 2006, **113**(3):453-465.
13. Rieseberg LH, Doyle MF: **Tetrasomic segregation in the naturally occurring autotetraploid *Allium nevii* (Alliaceae)**. *Hereditas* 1989, **111**(1):31-36.

- 470 14. Stift M, Berenos C, Kuperus P, Van Tienderen P: **Segregation Models for Disomic,**
 471 **Tetrasomic and Intermediate Inheritance in Tetraploids: A General Procedure**
 472 **Applied to *Rorippa* (Yellow Cress) Microsatellite Data.** *Genetics* 2008, **179**:2113-
 473 2123.
- 474 15. Allendorf FW, Danzmann RG: **Secondary Tetrasomic Segregation of MDH-B and**
 475 **Preferential Pairing of Homeologues in Rainbow Trout.** *Genetics* 1997, **145**(4):1083-
 476 1092.
- 477 16. Fjellstrom RG, Beuselinck PR, Steiner JJ: **RFLP marker analysis supports tetrasomic**
 478 **inheritance in *Lotus corniculatus* L.** *TAG Theoretical and Applied Genetics* 2001,
 479 **102**(5):718-725.
- 480 17. Jackson RC, Jackson JW: **Gene segregation in autotetraploids: prediction from**
 481 **meiotic configurations.** *American Journal of Botany* 1996, **83**(6):673-678.
- 482 18. Danzmann RG, Bogart JP: **Further evidence for a polymorphism in gametic**
 483 **segregation in the tetraploid treefrog *hyla versicolor* using a glutamate oxaloacetic**
 484 **transaminase locus.** *Genetics* 1983, **103**(4):753-769.
- 485 19. Hickok LG: **Homoeologous chromosome pairing: frequency differences in inbred**
 486 **and intraspecific hybrid polyploid ferns.** *Science* 1978b, **202**:982-984.
- 487 20. Marsden JE, Schwager SJ, May B: **Single-Locus Inheritance in the Tetraploid**
 488 **Treefrog *Hyla versicolor* With an Analysis of Expected Progeny Ratios in Tetraploid**
 489 **Organisms.** *Genetics* 1987, **116**(2):299-311.
- 490 21. Bousalem M, Arnau G, Hochu I, Arnolin R, Viader V, Santoni S, David J: **Microsatellite**
 491 **segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the**
 492 **American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the**
 493 ***Dioscoreae*.** *TAG Theoretical and Applied Genetics* 2006, **113**(3):439-451.
- 494 22. Catalan P, Segarra-Moragues JG, Palop-Esteban M, Moreno C, Gonzalez-Candelas F: **A**
 495 **Bayesian Approach for Discriminating Among Alternative Inheritance Hypotheses**
 496 **in Plant Polyploids: The Allotetraploid Origin of Genus *Borderea* (Dioscoreaceae).**
 497 *Genetics* 2006, **172**(3):1939-1953.
- 498 23. Olson MS: **Bayesian Procedures for Discriminating Among Hypotheses With**
 499 **Discrete Distributions: Inheritance in the Tetraploid *Astilbe biternata*.** *Genetics* 1997,
 500 **147**(4):1933-1942.
- 501 24. Pairon MC, Jacquemart AL: **Disomic segregation of microsatellites in the tetraploid**
 502 ***Prunus serotina* Ehrh. (*Rosaceae*).** *Journal of the American Society for Horticultural*
 503 *Science* 2005, **130**(5):729-734.

25. Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT: **Assessing genetic diversity and population structure in a *citrus* germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs).** *TAG Theoretical and Applied Genetics* 2006, **112**(8):1519-1531.
26. Bayer RJ, Mabberley DJ, Morton C, Miller CH, Sharma IK, Pfeil BE, Rich S, Hitchcock R, Sykes S: **A molecular phylogeny of the orange subfamily (*Rutaceae: Aurantioideae*) using nine cpDNA sequences.** *Journal of Botany* 2009, **96**(3):668-685.
27. Froelicher Y, Mouhaya W, Bassene JB, Costantino G, Kamiri M, Luro F, Morillon R, Ollitrault P: **New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal *citrus* phylogeny.** *Tree Genetics & Genomes* 2010:DOI: 10.1007/s11295-11010-10314-x.
28. Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, Malfa SI, Continella G, Tribulato E: ***Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers.** *TAG Theoretical and Applied Genetics* 2000, **100**(8):1155-1166.
29. Swingle WT, Reece PC: **The botany of citrus and its wild relatives.** *The citrus industry, University of California ed Reuther W, Webber HJ & Bachelor LD: Riverside, California* 1967, **1**:190-430.
30. Herrero R, Asins MJ, Pina JA, Carbonell EA, Navarro L: **Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species.** *TAG Theoretical and Applied Genetics* 1996, **93**(8):1327-1334.
31. Ollitrault P, Jacquemond C, Dubois C, Luro F: **Botany and genetic resources.** *Genetic diversity of cultivated tropical plants* 2003:193-214.
32. Grosser J, Gmitter F: **Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2010:1-15.
33. Grosser JW: **Observations and suggestions for improving somatic hybridization by plant protoplast isolation, fusion, and culture.** *HortScience* 1994, **29**(11):1241-1243.
34. Grosser JW, Chandler JL: **Somatic hybridization of high yield, cold-hardy and disease resistant parents for *citrus* rootstock improvement.** *J Hort Sci Biotechnol* 2000, **75**:641 - 644.
35. Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Bakry F, Aubert B: **Rootstock breeding strategies for the Mediterranean citrus industry; the somatic hybridization potential.** *Fruits (Paris)* 1998, **53**(5):335-344.

36. Ollitrault P, Guo WW, Grosser JW: **Somatic hybridization**. In *Citrus genetics, breeding and biotechnology* 2007:235-260.
37. Grosser JW, Ollitrault P, Olivares-Fuster O: **Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement**. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2000, **36**(6):434-439.
38. Ollitrault P, Froelicher Y, Dambier D, Seker M: **Rootstock breeding by somatic hybridisation for the Mediterranean citrus industry**. In: *Proceedings of the First International Symposium on Citrus Biotechnology, Eilat, Israel, 29 November to 3 December, 1998: 2000c; 2000c*: 157-162.
39. Dambier D, Benyahia H, Pensabene-Bellavia G, Aka K, Froelicher Y, Belfalah Z, Morillon R, Printz B, Lhou B, Handaji N *et al*: **Somatic hybridization for Citrus rootstock breeding: an effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry**. *Plant Cell Reports* submitted.
40. Murashige T, Tucker DPH: **Growth factor requirements of tissue culture**. *Proc First Intl Citrus Symp* 1969, **3**:1155-1161.
41. Ollitrault P, Dambier D, Allent V, Luro F, Jacquemond C: **In vitro rescue and selection of spontaneous triploids by flow cytometry for easy peeler Citrus breeding** *Proceedings of the Eighth International Citrus congress International Society of Citriculture, Sun City, South Africa* 1996, **2**:913-917.
42. Gawel NJ, Jarret RL: **A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea**. *Plant Mol Biol* 1991, **9**:374-380.
43. Sambrook J, Russell DW: **Fluorometric Quantitation of DNA Using Hoechst 33258**. *Analytical biochemistry* 2006, **2006**(1):pdb.prot4458-.
44. Froelicher Y, Dambier D, Bassene JB, Costantino G, Lotfy S, Didout C, Beaumont V, Brottier P, Risterucci AM, Luro F *et al*: **Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (Citrus reticulata Blanco)**. *Molecular Ecology Resources* 2008, **8**(1):119-122.
45. Luro F, Costantino G, Terol J, Argout X, Allario T, Wincker P, Talon M, Ollitrault P, Morillon R: **Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine(Citrus clementina Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping**. *BMC genomics* 2008, **9**(1):287.
46. Ollitrault F, Terol J, Pina JA, Navarro L, Talon M, Ollitrault P: **Development of SSRs markers from Citrus clementina (Rutaceae) BACend sequences and interspecific transferability in Citrus**. *American Journal of Botany* accepted.

47. Perrier X, Jacquemoud-Collet J: **DARwin software**. Cirad-Bios UPR Genetic Improvement of Vegetatively Propagated Crops, distributed by the authors at (<http://darwinciradfr/darwin>) 2006.
48. Ollitrault P, Terol J, Chen C, Federici CT, Lotfy S, Hippolyte I, Ollitrault F, Bérard A, Chauveau A, Costantino G *et al*: **A reference linkage map of *C. clementina* based on SNPs, SSRs and InDels**
In: *Plant and Animal Genome XIX Conference: January 15-19, 2011 2011; San Diego, California, USA*; 2011.
49. Esselink GD, Nybom H, Vosman B: **Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting-peak ratios) method**. *Theoretical and Applied Genetics* 2004, **109**(2):402-408.
50. Durham RE, Liou PC, Gmitter FG, Jr., Moore GA: **Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in Citrus**. *Theoretical and Applied Genetics* 1992, **84**(1-2):39-48.
51. Jarrell DC, Roose ML, Traugh SN, Kupper RS: **A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross**. *Theoretical and Applied Genetics* 1992, **84**(1-2):49-56.
52. Ruiz C, Asins M: **Comparison between Poncirus and Citrus genetic linkage maps**. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 2003, **106**(5):826-836.
53. Torres AM, Mau-Lastovicka T, Williams TE, Soost RK: **Segregation distortion and linkage of Citrus and Poncirus isozyme genes**. *Journal of Heredity* 1985, **76**(4):289-294.
54. Luro F, Lorieux M, Laigret F, Bove JM, Ollitrault P: **Genetic mapping of an intergeneric citrus hybrid using molecular markers**. In: *Symposium on tropical orchards, Montpellier, France, 30 Aug-5 Sep, 1993: 1994; 1994: 404-408, 483-485*.
55. Bernet G, Fernandez-Ribacoba J, Carbonell E, Asins M: **Comparative genome-wide segregation analysis and map construction using a reciprocal cross design to facilitate citrus germplasm utilization**. *Molecular Breeding* 2010, **25**(4):659-673.
56. Lyttle TW: **Segregation Distorters**. *Annu Rev Genet* 1991, **25**:511-557.
57. Kamiri M, Stift M, Srairi I, Costantino G, El Moussadik A, Hmyene A, Bakry F, Ollitrault P, Froelicher Y: **Evidence for non-disomic inheritance in a Citrus interspecific tetraploid somatic between *C. reticulata* and *C. lemon* hybrid using SSR markers and cytogenetic analysis**. *Plant Cell Reports* Submitted.

58. Cameron J, W., Garber MJ: **Identical-twin hybrids of Citrus x Poncirus from strictly sexual seed parents** *American Journal of Botany* 1968, **55**:199-205.
59. Chen CL, Guo WW, Yi HL, Deng XX: **Cytogenetic analysis of two interspecific Citrus allotetraploid somatic hybrids and their diploid fusion parents.** *Plant Breeding* 2004, **123**(4):332-337.
60. Del Bosco SF, Tusa N, Conicella C: **Microsporogenesis in a Citrus interspecific tetraploid somatic hybrid and its fusion parents.** *Heredity* 1999, **83**(4):373-377.
61. Jackson RC, Casey J: **Cytogenetic analyses of autopolyploids: models and methods for triploids to octoploids.** *American Journal of Botany* 1982, **69**(4).
62. Jenczewski E, Eber F, Manzanares-Dauleux MJ, Chevre AM: **A strict diploid-like pairing regime is associated with tetrasomic segregation in induced autotetraploids of kale.** *Plant Breeding* 2002, **121**(2):177-179.
63. Curole JP, Hedgecock D: **Estimation of Preferential Pairing Rates in Second-Generation Autotetraploid Pacific Oysters (Crassostrea gigas).** *Genetics* 2005, **171**(2):855-859.
64. Jannoo N, Grivet L, David J, D'Hont A, Glaszmann JC: **Differential chromosome pairing affinities at meiosis in polyploid sugarcane revealed by molecular markers.** *Heredity* 2004, **93**(5):460-467.
65. Haynes KG, Douches DS: **Estimation of the coefficient of double reduction in the cultivated tetraploid potato.** *TAG Theoretical and Applied Genetics* 1993, **85**(6):857-862.
66. Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Froelicher Y: **Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus.** *Plant Breeding Reviews* 2008, **30**:323-352.
67. Wu SS, Wu RL, Ma CX, Zeng ZB, Yang MCK, Casella G: **A Multivalent Pairing Model of Linkage Analysis in Autotetraploids.** *Genetics* 2001, **159**(3):1339-1350.

Figure Captions

Figure 1: Ploidy evaluation of Chandler pummelo x (Willowleaf mandarin + Pomeroy Poncirus) progeny: Mitotic chromosome counts from young leaf preparation of a progeny sample of CHA X WLM+PON showing 27 chromosomes counterstained with DAPI.

Figure 2: Deviance (fit) of 4 observed SSR loci segregation in WLM+PON somatic hybrid to inheritance models ranging from $\tau=0$ (full disomic) to $\tau=1$ (full tetrasomic).

Figure 3: Interparental heterozygosity transmission rate in 16 SSR segregating intermediately with homologous preferential pairing in CHA X WLM+PON triploid progeny.

Figure 4: Distribution of genetic dissimilarities between diploid gametes of WLM+PON somatic hybrid based on intergeneric segregation (a) and all alleles segregation (b).

Table 1: Characteristics of selected SSR markers used for Willowleaf mandarin+ Pomeroy *Poncirus* somatic hybrid (WLM+PON) allelic inheritance study.

| Locus | EMBL | Linkage group | Primer sequence (5'–3') | Tm (C°) |
|--------------|----------|---------------|-----------------------------------------------------|---------|
| mCrCIR02D09 | FR677569 | 2 | F:AATGATGAGGGTAAAGATG R:ACCCATCACAAAACAGA | 55 |
| MEST46 | FC901824 | 2 | F : AACCAGAATCAGAACCCGA R : GGTGAGCATCTGGACGACTT | 55 |
| mCrCIR02G12 | FR677575 | 3 | F:AAACCGAAATACAAGAGTG R:TCCACAAACAATACAACG | 55 |
| CiBE5055 | ET111355 | 1 | F:AACAGTGGTTCTGGGAAATAG R:GGTGGTCTCAAAGTCATCATC | 55 |
| MEST431 | FC883898 | 1 | F : GAGCTCAAAACAATAGCCGC R : CATACTCCCCGTCCATCTA | 55 |
| mCrCIR02D04b | FR677564 | 4 | F:CTCTCTTTCCCCATTAGA R:AGCAAACCCCACAAC | 50 |
| mCrCIR03D12a | FR677577 | 4 | F:GCCATAAGCCCTTTCT R:CCCACAACCATCACC | 50 |
| mCrCIR07D06 | FR677581 | 4 | F:CCTTTTCACAGTTTGCTAT R:TCAATTCCTCTAGTGTGTGT | 55 |
| mCrCIR03F05 | FR692364 | 4 | F:CTAAGGAAGAGTAGAGAGCA R:TAAAATCCAAGGTTCCA | 50 |
| mCrCIR01F08a | AM489737 | 5 | F:ATGAGCTAAAGAGAAGAGG R:GGACTCAACACAACACAA | 50 |
| mCrCIR07E12 | AM489750 | 5 | F:TGTAGTCAAAAGCATCAC R:TCTATGATTCTGACTTTA | 50 |

| | | | | |
|-------------|----------|---|------------------------------------------------|----|
| mCrCIR02A09 | FR677568 | 8 | F:ACAGAAGGTAGTATTTTAGGG R:TTGTTTGGATGGGAAG | 50 |
| mCrCIR07B05 | AM489747 | 8 | F:TTTGTTCTTTTGGTCTTTT R:CTTTCTTTCCTAGTTTCCC | 50 |
| mCrCIR02G02 | FR677572 | 8 | F:CAATAAGAAAACGCAGG R:TGGTAGAGAAACAGAGGTG | 55 |
| mCrCIR02F12 | FR677570 | 6 | F:GGCCATTTCTCTGATG R:TAAGTGAGGGATTGGTTT | 55 |
| mCrCIR02D03 | FR692360 | 7 | F:CAGACAACAGAAAACCAA R:GACCATTTTCCACTCAA | 55 |
| mCrCIR07E05 | AM489749 | 7 | F:GGAGAACAAAACACAATG R:ATCTTTCGGACAATCTT | 50 |
| mCrCIR07C09 | AJ567410 | 9 | F:GACCCTGCCTCCAAAGTATC R:GTGGCTGTTGAGGGGTTG | 55 |
| mCrCIR02B07 | AJ567403 | 9 | F:CAGCTCAACATGAAAGG R:TTGGAGAACAGGATGG | 50 |

Tm: Final annealing temperature

Table 2. Distribution of observed genotypes in the Chandler pummelo x (Willowleaf mandarin + Pomeroy Poncirus) progeny at the 19 studied loci. For 3 of these loci allelic distortion, have been observed (*). Corresponding P values for “Allelic distortion” are given.

| Locus | Linkage group | Parental genotypes | | Progeny observed genotypes | | | | | | Allelic distortion p value |
|--------------|---------------|--------------------|-----|----------------------------|----|----|----|----|----|----------------------------|
| | | WLM | PON | AA | AB | AC | BB | CC | BC | |
| mCrCIR02D09 | 2 | AB | CC | 1 | 0 | 25 | 1 | 1 | 30 | 0,79 |
| MEST46 | 2 | BB | AA | 2 | 56 | 0 | | | | 0,71 |
| mCRCIR02G12 | 3 | CC | AB | 2 | 3 | 25 | 1 | 0 | 27 | 0,54 |
| CiBE5055 | 1 | BC | AA | 5 | 22 | 28 | 0 | 0 | 3 | 0,68 |
| MEST431 | 1 | BB | AA | 5 | 46 | 7 | | | | 0,68 |
| mCrCIR02D04b | 4 | AA | BC | 5 | 28 | 24 | 0 | 0 | 1 | 0,66 |
| mCrCIR03D12a | 4 | AA | BC | 1 | 28 | 24 | 1 | 1 | 3 | 0,66 |
| mCrCIR07D06 | 4 | AB | CC | 0 | 0 | 26 | 0 | 6 | 26 | 0,54 |
| mCrCIR03F05 | 4 | BB | AC | 2 | 27 | 8 | 0 | 4 | 17 | 0,02* |
| mCrCIR01F08a | 5 | BB | AA | 3 | 50 | 5 | | | | 0,71 |
| mCrCIR07E12 | 5 | AC | BB | 0 | 26 | 5 | 2 | 0 | 25 | 0,79 |
| mCrCIR02A09 | 8 | CC | AB | 1 | 1 | 28 | 0 | 2 | 26 | 0,87 |
| mCrCIR07B05 | 8 | BB | AA | 1 | 55 | 2 | | | | 0,85 |

Résultats et discussion – Etude de la ségrégation allélique chez un hybride somatique intergénérique

| | | | | AB | AC | AD | CD | BD | BC | |
|-------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------|
| mCrCIR02G02 | 8 | AB | CD | 2 | 23 | 7 | 1 | 12 | 13 | 0,14 |
| mCrCIR02F12 | 6 | AB | C0 | 3 | 14 | 10 | 1 | 9 | 21 | 0,16 |
| mCrCIR02D03 | 7 | AB | AC | 1 | 1 | 1 | 5 | 28 | 22 | 1,14E-06* |
| mCrCIR07E05 | 7 | BB | AA | 4 | 51 | 3 | | | | 0,85 |
| mCrCIR07C09 | 9 | AC | BC | 1 | 20 | 7 | 1 | 11 | 18 | 0,04* |
| mCrCIR02B07 | 9 | AC | BB | 0 | 25 | 3 | 5 | 2 | 23 | 0,97 |

WLM : *Citrus reticulata* cv Willowleaf mandarin

PON : *Poncirus trifoliata* cv Pomeroy

WLM+EUR : *Citrus reticulata* cv Willowleaf mandarin + *Poncirus trifoliata* cv Pomeroy

CHA : *Citrus maxima* cv Chandler pummelo

A, B, C, D: allele length (A represents the longest allele)

0: null allele

Table 3: Fitting inheritance model and rates of intraparental and interparental heterozygosity on segregation of 16 SSR loci in CHA X WLM+PON triploid progeny.

| SSR | Linkage group | WLM | PON | WLM+PON | Pref Pairing | Best model | | | | % Heterozygosity | |
|--------------|---------------|-----|-----|---------|--------------|------------|------|-------|----------|------------------|---------------|
| | | | | | | Betatau | Tau | LRT | p value | Intraparenatl | Interparental |
| mCrCIR02D09 | 2 | AB | CC | ABCC | AB/CC | 0,07 | 0,07 | 20,03 | 4,00E-06 | 2% | 95% |
| MEST46 | 2 | BB | AA | AABB | AA/BB | - | 0,1 | 32,04 | 7,56E-09 | 0% | 97% |
| mCrCIR02G12 | 3 | CC | AB | ABCC | CC/AB | 0,05 | 0,21 | 12,74 | 1,79E-04 | 5% | 90% |
| CiBE5055 | 1 | BC | AA | AABC | BC/AA | - | 0,41 | 5,79 | 8,04E-03 | 5% | 86% |
| MEST431 | 1 | AA | BB | AABB | AA/BB | - | 0,58 | 4,41 | 1,78E-02 | 0% | 79% |
| mCrCIR02D04b | 4 | AA | BC | AABC | AA/BC | - | 0,31 | 8,39 | 1,89E-03 | 2% | 90% |
| mCrCIR03D12a | 4 | AA | BC | AABC | AA/BC | 0,04 | 0,23 | 11,42 | 3,64E-04 | 5% | 90% |
| mCrCIR07D06 | 4 | AB | CC | ABCC | AB/CC | - | 0,31 | 8,39 | 1,89E-03 | 0% | 90% |
| mCrCIR01F08a | 5 | BB | AA | AABB | AA/BB | - | 0,41 | 11,45 | 3,57E-04 | 0% | 86% |
| mCrCIR07E12 | 5 | AC | BB | ABBC | AC/BB | - | 0,36 | 7,01 | 4,06E-03 | 9% | 88% |
| mCrCIR02A09 | 8 | CC | AB | ABCC | CC/AB | 0,03 | 0,14 | 14,19 | 8,20E-05 | 2% | 93% |
| mCrCIR07B05 | 8 | BB | AA | AABB | AA/BB | - | 0,16 | 27,26 | 8,88E-08 | 0% | 95% |

| | | | | | | | | | | | |
|-------------|---|----|----|------|-------|------|------|-------|----------|----|-----|
| mCrCIR02G02 | 8 | AB | CD | ABCD | AB/CD | - | 0,16 | 13,79 | 1,02E-04 | 5% | 95% |
| mCrCIR02F12 | 6 | AB | C0 | ABC0 | AB/C0 | - | 0,21 | 11,73 | 3,07E-04 | 7% | 93% |
| mCrCIR07E05 | 7 | BB | AA | AABB | AA/BB | - | 0,36 | 13,86 | 9,90E-05 | 0% | 88% |
| mCrCIR02B07 | 9 | AC | BB | ABBC | AC/BB | 0,07 | 0,38 | 6,34 | 5,89E-03 | 5% | 83% |

Comparison of fit has been made between tetrasomic null model and the best fitting intermediate model. LRT values were evaluated as described in Materials and methods and are significant at the indicative level.

WLM : *Citrus reticulata* cv Willowleaf mandarin

EUR : *Citrus limon* cv Eureka lemon

WLM+EUR : *Citrus reticulata* cv Willowleaf mandarin + *Citrus limon* cv Eureka lemon somatic hybrid

CHA : *Citrus maxima* cv Chandler pummelo

A, B, C, D: allele length (A represents the longest allele)

0: null allele

Table 4: Observed and estimated double reduction rates per locus for WLM+PON produced gametes.

| Locus | Parental type | Observed double reduction rate | Estimated double reduction rate |
|--------------|----------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|
| mCrCIR02D09 | ABCC | 0,034 | 0,070 |
| mCrCIR03D12a | AABC | 0,034 | 0,041 |
| mCrCIR02G12 | ABCC | 0,052 | 0,052 |
| mCrCIR07D06 | ABCC | 0,000 | 0,003 |
| mCrCIR02A09 | ABCC | 0,017 | 0,034 |
| mCrCIR02B07 | ABBC | 0,034 | 0,069 |

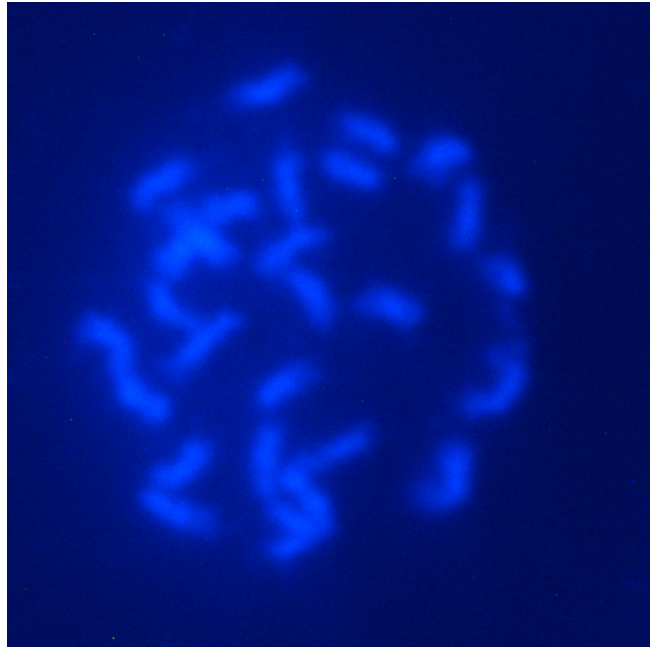


Figure 1

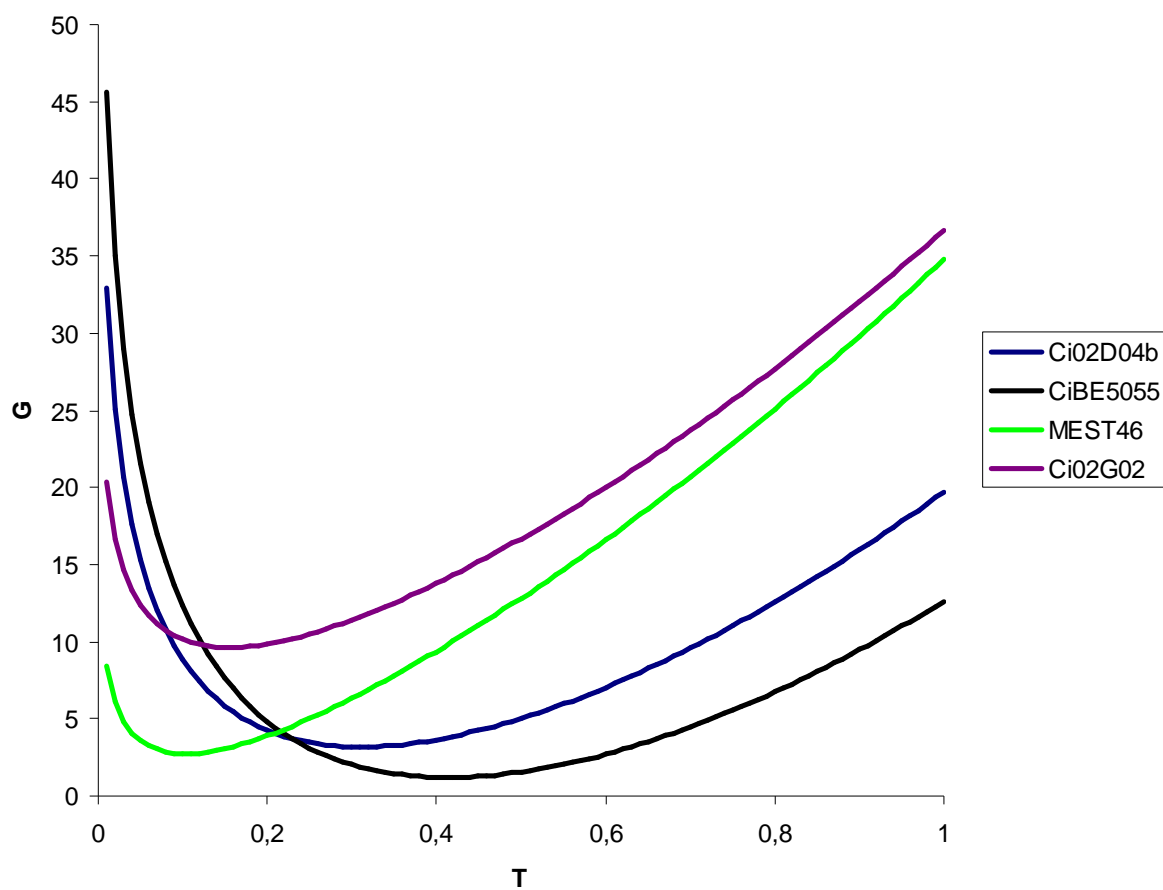


Figure 2

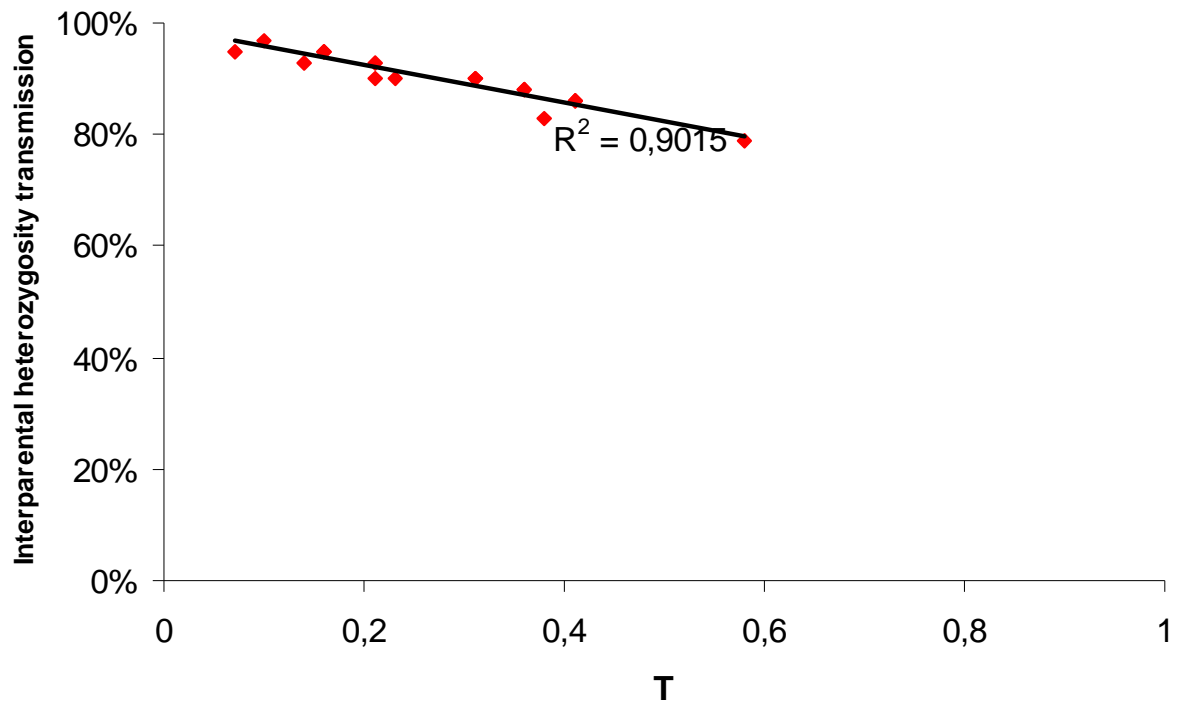


Figure 3

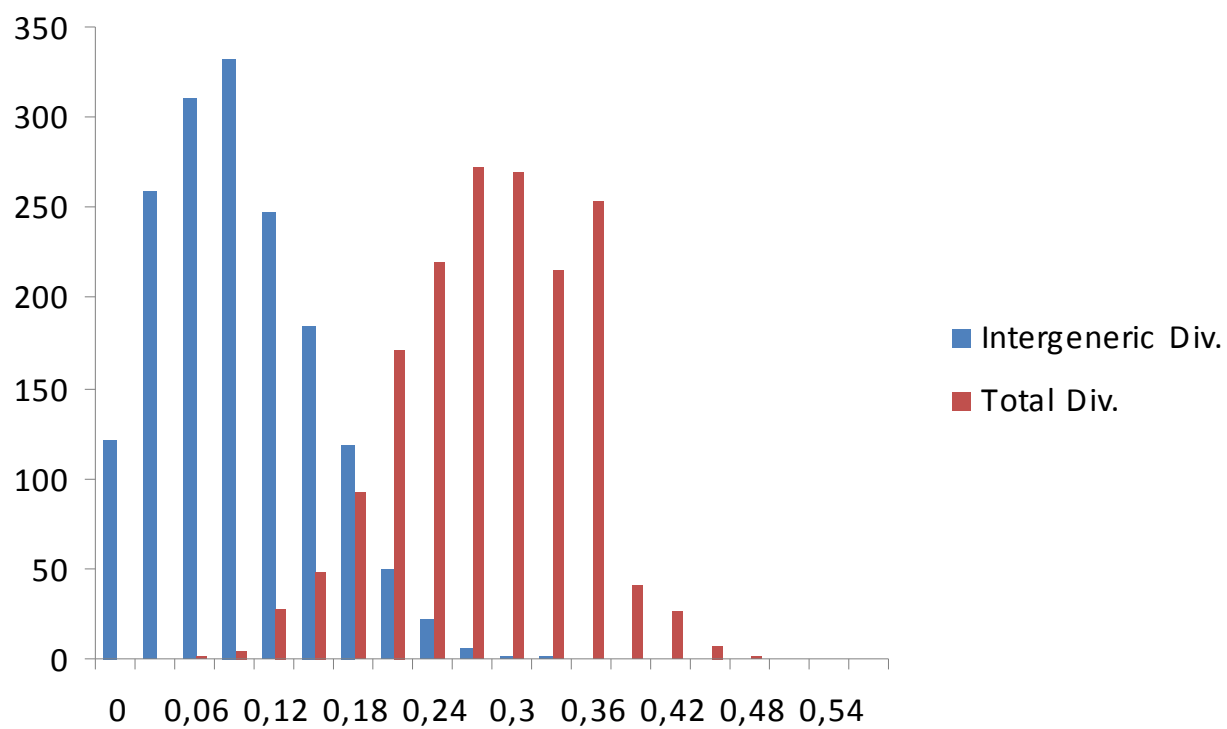


Figure 4

V. DISCUSSION GÉNÉRALE

V.1 BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION DES HYBRIDES SOMATIQUES D'AGRUMES

Le développement de nouveaux cultivars d'agrumes par les méthodes de sélection classique a été limité par la complexité de leur système de reproduction (Grosser et Gmitter 1990a; Swingle et Reece 1967) caractérisé par la présence de stérilité, de l'apomixie partielle et de gènes d'incompatibilité. L'hybridation somatique a permis de contourner cette complexité et de combiner des variétés possédant un potentiel intéressant et complémentaire (Grosser et Gmitter 1990a; Grosser et Gmitter 1990b). L'intérêt des hybrides somatiques obtenus est double, ils peuvent être utilisés directement dans les programmes de sélections de porte-greffe ou ils peuvent rentrer dans les programmes de création variétale pour générer des cultivars triploïdes lors de croisements avec des diploïdes (Ollitrault, *et al.* 2008). Dans ce dernier cas, il est donc particulièrement important de connaître la transmission de ce système de reproduction à l'hybride somatique. De plus, la distance génétique entre les parents peut avoir une grande influence sur le mode d'appariement chromosomique et de recombinaison ayant lieu à la méiose. Les relations entre les génomes parentaux peuvent entraîner des irrégularités méiotiques et avoir des conséquences sur la viabilité des gamètes produits (Jong, *et al.* 1993). A ce jour, seules des études partielles sur la transmission des caractères liés à la biologie de la reproduction ont été réalisées chez des hybrides somatiques d'agrumes. Sur la base de sept combinaisons associant des parents aux phénotypes très contrastés, WLM, EUR, PON, SRG, COC, MEL et SHO, la transmission de plusieurs caractères phénotypiques a été étudiée chez sept hybrides somatiques tétraploïdes.

V.1.1 Contributions parentales à l'élaboration du système de reproduction de l'hybride somatique et plus généralement au phénotype.

Les processus responsables des modifications fonctionnelles et structurales chez les hybrides somatiques liées à la combinaison de deux génomes distincts restent encore mal compris (Albertin, *et al.* 2007). Ces modifications, pouvant conduire à l'apparition de nouveaux phénotypes, absents chez les parents diploïdes, sont dues à une hérédité non additive chez les

allopolyploïdes (Chen et Zhongfu 2006; Comai 2005; Madlung, *et al.* 2002; Osborn, *et al.* 2003).

L'étude réalisée sur la transmission de la morphologie florale, de la fertilité mâle et femelle, des caractéristiques polliniques et de l'apomixie a été conduite sur sept hybrides somatiques allotétraploïdes d'agrumes. Ces hybrides somatiques présentent majoritairement des phénotypes intermédiaires ou proches de l'un ou l'autre des parents diploïdes mais aussi de nouveaux phénotypes, différents des phénotypes parentaux.

Au niveau de la morphologie florale, les hybrides somatiques étudiés, peuvent présenter des phénotypes intermédiaires aux phénotypes parentaux avec ou sans dominance de l'un des parents. Ainsi certains caractères, affichés par ces hybrides somatiques, évoquent une expression additive des gènes, tels que le nombre moyen d'étamines de WLM+SRG et SRG+COC qui est intermédiaire aux 2 parents. Par ailleurs, WLM+SRG et SRG+MEL affichent une longueur de pétales intermédiaire aux parents diploïdes avec dominance du phénotype de SRG. D'autres caractères suggèrent une expression transgressive, tels que le diamètre moyen des fleurs chez WLM+PON et SRG+MEL ou la longueur moyenne des pétales chez MEL+SHO et WLM+SHO. En effet, ces caractères présentent des tailles supérieures aux deux parents diploïdes. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par (Kobayashi, *et al.* 1995). Les hybrides somatiques étudiés ont montré certains phénotypes intermédiaires et d'autres différents de leurs parents diploïdes. Ces différences d'envergure pourraient être dues à l'augmentation du niveau de ploïdie. Effectivement, une des conséquences de la polyploïdisation est l'augmentation du volume cellulaire (Cavalier-Smith 1978). Cette augmentation du volume cellulaire se traduit par la formation d'organes végétatifs et reproductifs plus volumineux que chez les parents diploïdes (Otto et Whitton 2000). D'un point de vue plus global, les hybrides somatiques impliquant le SRG présentent un appareil floral plus proche de ce dernier pendant que ceux impliquant WLM possèdent une fleur plus proche du second parent.

Au niveau pollinique, la taille des grains de pollen produits par les hybrides somatiques est comparable à un des deux parents ou supérieure aux deux. Les hybrides somatiques WLM+EUR, SRG+COC et WLM+SRG présentent des taux de germination et de viabilité polliniques intermédiaires aux deux parents diploïdes mais plus proches du parent le plus faible. En revanche, les hybrides somatiques WLM+PON, WLM+SHO et MEL+SHO montrent des taux de germination et de viabilité polliniques inférieurs à leurs deux parents.

L'ensemble des hybrides somatiques se différencie des parents diploïdes par un taux de micropollen produit plus élevé à l'exception de WLM+PON.

Des résultats similaires, au niveau pollinique, ont été observés chez trois hybrides somatiques interspécifiques d'agrumes : Orange Hamlin+Rough lemon, Orange Valencia+Lime Key et Orange Valencia+Citron Femminello (Chen, *et al.* 2004; Del Bosco, *et al.* 1999). Le taux de micropollen généralement corrélé positivement au taux d'univalents produits lors de la méiose (Chen, *et al.* 2004) et négativement à la viabilité pollinique (Del Bosco, *et al.* 1999) peut être indicatif d'une homologie génomique entre les parents diploïdes. En effet, malgré une compatibilité sexuelle entre ces parents diploïdes, l'hybride somatique WLM+PON, hybride intergénérique, affiche un taux nul de micropollen produit. Ce résultat peut être dû à une homologie réduite au niveau intergénérique.

Le nombre moyen de pépins par fruit, représente une mesure approximative de la fertilité femelle d'une espèce. Le nombre moyen de pépins chez les *Citrus* est associé à la taille du fruit ainsi qu'aux conditions environnementales (García, *et al.* 2000). L'évaluation de cette fertilité est compliquée par l'embryonie nucellaire des variétés étudiées. Cependant la fertilité femelle de l'ensemble des hybrides somatiques est intermédiaire à celle de leurs parents diploïdes. Une dominance du SRG, pour la fertilité femelle, est observée pour l'ensemble des hybrides somatiques impliquant ce dernier. Cependant, aucune dominance du mandarinier n'est observée au niveau des hybrides somatiques l'impliquant. Une tendance générale de non additivité et de dominance du SRG sur les autres parents diploïdes est observée au niveau de l'ensemble des hybrides somatiques étudiés.

Ainsi, les observations effectuées sur les caractères liés à la biologie de la reproduction mettent plutôt en évidence une tendance globale de non additivité avec une dominance du SRG sur les autres parents. En revanche, chez les hybrides somatiques résultants des combinaisons avec le mandarinier, aucune dominance de ce dernier n'a été observée.

Plusieurs travaux accomplis sur la transmission de phénotypes chez les hybrides somatiques d'agrumes tels que les polyphénols de la pulpe (Tusa, *et al.* 2007), les composés aromatiques des feuilles (Alonzo, *et al.* 2000; Del Bosco, *et al.* 1998; Gancel, *et al.* 2006; Gancel, *et al.* 2003; Gancel, *et al.* 2005a; Gancel, *et al.* 2005b) ou les teneurs en acides organiques et sucres (Bassene, *et al.* 2009a; Bassene, *et al.* 2009b) attestent de la difficulté de prévision des phénotypes des hybrides en fonction des parents. Ainsi, chez les agrumes l'étude des composés aromatiques des feuilles d'un dispositif diallèle d'hybrides somatiques a mis en évidence l'importance de cette variance d'interactions (Gancel 2004). Les profils qualitatifs et quantitatifs des composés aromatiques des hybrides entre le mandarinier commun (*C. reticulata*) et le limetier mexicain (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.), le citronnier Eureka (*C. limon* (L.) Burm.), l'oranger Shamouti (*C. sinensis* (L.) Osb.), le pomelo Star Ruby (*C.*

paradisi Macfayden), le kumquat Nagami (*Fortunella margarita* (Lour.) Swing.), le poncirus (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) sont marqués par la dominance du mandarinier sur les autres parents. En revanche, chez les hybrides somatiques résultants des combinaisons entre le limetier, le citronnier, le cédratier, l'oranger et le pomelo, aucune dominance n'a été clairement observée contrairement aux hybridations impliquant le mandarinier (Gancel, *et al.* 2005a). Chez des hybrides allotétraploïdes entre *Arabidopsis thaliana* et *A. arenosa*, les mêmes phénomènes de dominance ont été observés. Ces hybrides présentent une morphologie variable mais très proche du parent *A. arenosa* ; on parle alors d'une dominance morphologique d'*A. arenosa* sur *A. thaliana* (Comai 2000; Madlung, *et al.* 2002; Wang, *et al.* 2006).

L'évaluation de la transmission de l'apomixie et de la mono/polyembryonie chez les hybrides somatiques est plus complexe. En effet, SRG+MEL, WLM+SRG et WLM+SHO ont montré des taux de polyembryonie largement inférieurs à leurs parents diploïdes. De plus, les descendance de WLM+SRG et WLM+SHO ont montré des taux élevés de plants zygotiques en comparaison avec leurs parents respectifs.

Plusieurs modèles de contrôle génétique de l'apomixie ont été proposés auparavant dans la littérature. Parlevliet et Cameron (1959) suggèrent que l'apomixie/polyembryonie seraient contrôlés par un gène dominant *P*. Les résultats obtenus lors de notre étude chez l'hybride somatique SRG+COC écartent ce modèle. En effet, en considérant un contrôle monogénique de ces caractères, la descendance d'un hybride somatique de cédratier et de pomelo devrait être fortement apomictique et polyembryonnée. Cameron et Soost (1979) ont constaté que les ratios de ségrégation dans certaines populations n'étaient pas compatibles avec le modèle gène dominant unique. Ils ont alors révisé ce premier modèle et ont proposé un second à deux gènes dominants, chacun étant hétérozygote chez le *Poncirus* *P1p1 P2p2*. Hong *et al.* (2001) ont proposé un modèle avec deux gènes complémentaires *A1* et *A2*.

La transmission de l'apomixie a été ensuite décrite chez le *Poncirus* comme étant basée sur un gène dominant *Ne1*. Ce gène conférant le caractère d'embryonie nucellaire étant hétérozygote chez le *Poncirus* *Ne1 ne1* (Kepiro et Roose 2009). D'autres travaux suggèrent que l'apomixie est un caractère à contrôle multigénique, indépendant de la polyembryonie. En effet, dans un croisement *Citrus volkameriana* X *Poncirus trifoliata*, deux positions génomiques chez *P. trifoliata* et six chez *C. volkameriana* se sont avérées responsables des variations apomictiques (García, *et al.* 1999). Asins *et al.* (2002), ont porté le nombre de régions responsables des variations de l'apomixie à huit chez *C. volkameriana*. Cependant, le modèle proposé par Garcia *et al.* (1999) et modifié par Asins *et al.* (2002) est basé sur une analyse

QTL. Les parents utilisés pour ce croisement possèdent une embryonie nucellaire, ce qui complique l'analyse de la transmission de l'apomixie.

Un modèle de transmission de l'apomixie et de la mono/polyembryonie chez les hybrides somatiques a été proposé à partir des travaux de Hong *et al.* (2001). Ce modèle implique deux gènes dominants *A* et *B* contrôlant l'apomixie et deux autres gènes dominants *C* et *D* contrôlant la mono/polyembryonie. Ainsi un génotype apomictique diploïde serait *A_B_* et un génotype polyembryonné *C_D_*. Toutefois, au niveau polyploïde, il semblerait que le rapport des doses des gènes *A* ; *B* et *C* ; *D* exerce un effet inverse « feedback » sur l'expression de ces gènes, conduisant à la réduction des taux de plants nucellaires et du taux de polyembryonie chez certains hybrides somatiques où ce rapport est élevé.

Ce modèle reste une hypothèse parmi plusieurs. En effet, la polyploïdie est connue pour induire des variations de l'expression génétique et des systèmes de régulation de cette expression (Osborn, *et al.* 2003). Des modifications épigénétiques peuvent aussi être responsables de ces variations de l'expression génétique comme observé pour des allopolyploïdes d'*Arabidopsis* et de *Brassica* (Chen 2007; Madlung, *et al.* 2002). Ces variations liées à la polyploïdisation peuvent mener à un élargissement de la gamme phénotypique chez les polyploïdes (Paterson 2005).

Le contrôle génétique de l'apomixie observé dans les agrumes est assez complexe par rapport aux connaissances actuelles sur le contrôle génétique de l'apomixie gamétophytique. La participation de plusieurs QTL dans le contrôle génétique de l'apomixie rend l'étude de la transmission de celle ci chez les hybrides somatiques très complexe.

V.2 L'ORIGINE GENETIQUE DES PLANTES PRESENTANT DIFFERENTS NIVEAUX DE PLOÏDIE ISSUES DE CROISEMENTS ENTRE DIPLOÏDES ET HYBRIDES SOMATIQUES TETRAPLOÏDES D'AGRUMES

L'hybridation somatique permet d'accroître la diversité utile de complexes d'espèces, d'une part en contournant les incompatibilités ou contraintes sexuelles et, d'autre part en combinant les génomes nucléaires, chloroplastiques et mitochondriaux de cellules différentes (Ollitrault, *et al.* 2000b). Cette technique est d'une grande utilité dans les programmes de création variétale ou de porte-greffe chez les agrumes. En effet, cette technique permet d'obtenir des

hybrides somatiques tétraploïdes utilisables dans les croisements $2x \times 4x$ pour la création de cultivars triploïdes aspermes (Ollitrault, *et al.* 2008).

Cependant, dans certains croisements $2x \times 4x$, la situation est plus complexe car des plantules diploïdes, triploïdes et tétraploïdes ont été identifiées.

L'utilisation des marqueurs SSR codominants, polymorphes entre les parents, couplée à un dosage allélique via électrophorèse capillaire MAC-PR a été très utile pour étudier l'origine génétique des différentes plantes issues de ces croisements. L'analyse a ainsi permis de conclure que les tétraploïdes, issus dans les trois descendance FOM \times WLM+SRG, EUR \times MEL+SHO et EUR \times SRG+COC, sont issus de la fécondation de gamètes femelles non réduits $2n$ par du pollen de tétraploïdes.

La fréquence et le type de ces gamètes non réduits semblent dépendants de l'espèce, du génotype et des conditions environnementales (Barcaccia, *et al.* 1997). Une douzaine de gènes liés à la réduction méiotique et la restitution nucléaire a été observée et isolée chez *Arabidopsis* et d'autres plantes (Consiglio, *et al.* 2004; Kaul et Murthy 1985). Chez les agrumes, l'étude de la restitution de l'hétérozygotie maternelle a montré que la SDR est le principal mécanisme responsable de la production de $2n$ gamètes femelles chez la clémentine (Luro, *et al.* 2000) et le mandarinier Fortune (Cuenca et al, accepté). Cependant, d'après Chen *et al.* (2008) la FDR serait le mécanisme conduisant à la formation de $2n$ gamètes chez l'orange. Ainsi, dans nos croisements impliquant le mandarinier Fortune, les tétraploïdes sont issus de SDR. En revanche, les citronniers n'ayant jamais été étudiés pour leur mode de restitution, le faible nombre d'individus tétraploïdes obtenus dans nos populations ne nous a pas permis d'évaluer leur mode de formation. En effet, le mode de formation des $2n$ gamètes est déterminé de manière statistique sur des populations de plusieurs dizaines d'individus. Les hybrides tétraploïdes obtenus dans ces croisements pourront être très utiles, comme parents mâles, lors de backcross, pour éliminer les traits négatifs (Ferrante, *et al.* 2009).

L'analyse à l'aide des marqueurs SSR a révélé que les diploïdes obtenus dans les croisements EUR \times SRG+COC et EUR \times MEL+SHO ont une origine nucellaire. Cependant, les diploïdes obtenus dans le croisement FOM \times WLM+SRG se sont révélés d'origine zygotique. L'analyse réalisée via des SSR localisés sur 8 des 9 groupes de liaison de la carte génétique de la clémentine (Ollitrault, *et al.* 2011), ont montré que ces hybrides diploïdes disposaient des allèles du mandarinier Willowleaf ou du Pomelo Star Ruby en plus des allèles maternels du mandarinier Fortune. En effet, ces hybrides diploïdes ont affiché des allèles de WLM sur certains groupes de liaison et des allèles de SRG sur d'autres. Par ailleurs, chez certains hybrides diploïdes, des allèles issus de WLM et de SRG ont été observés pour deux

marqueurs situés sur un même groupe de liaison, laissant penser à une recombinaison génétique entre ces deux loci. Cette hypothèse est d'autant possible que la distance génétique entre les différents loci où ces recombinaisons sont suspectées est suffisante pour qu'une recombinaison génétique puisse se produire.

Des diploïdes ont déjà été observés dans des descendance de croisements interploïdaux. En effet, des diploïdes ont été observés dans des croisements 2x X 4x chez le millet (*Pennisetum glaucum*) (Dujardin et Hanna 1990) et chez la pomme de terre (Hanneman et Peloquin 1968). Cependant leurs origines n'ont pas été identifiées. Ces résultats mettent en évidence la capacité de l'hybride somatique WLM+SRG à produire un pollen haploïde viable.

V.3 ETUDE DE LA SEGREGATION ALLELIQUE CHEZ UN HYBRIDE SOMATIQUE INTERSPECIFIQUE WLM+EUR ET UN HYBRIDE SOMATIQUE INTERGENERIQUE WLM+PON D'AGRUMES

V.3.1 Les différents modes de ségrégation allélique chez les hybrides somatiques

Les hybrides somatiques sont le résultat de l'addition de deux génotypes différents et sont généralement considérés comme des allotétraploïdes. Chez les polyploïdes, le mode de ségrégation allélique dépend du degré d'homologie entre les chromosomes. En effet, chez les autotétraploïdes extrêmes, chaque chromosome possède trois autres homologues. Chacun de ces chromosomes peut ainsi s'apparier aléatoirement avec chacun de ces homologues en bivalents ou tétravalents durant la méiose, conduisant à une ségrégation tétrasomique. Lors de ce type de ségrégation, toutes les combinaisons alléliques possibles sont produites à la même fréquence (en cas d'absence de double réduction lors de la méiose). Chez les allotétraploïdes extrêmes, 2 paires de chromosomes homéologues sont présentes. Si l'appariement chromosomique a lieu entre chromosomes homologues, une ségrégation disomique se produit. Ce type de ségrégation est indicatif d'allotétraploïdie (Ramsey et Schemske 2002; Soltis et Soltis 1993).

Le mode de ségrégation peut passer de disomique à tétrasomique et vice versa. En effet, chez les autotétraploïdes les quatre chromosomes initialement homologues peuvent se différencier en deux paires de chromosomes à appariement préférentiel entraînant une diploïdisation génétique (Ramsey et Schemske 2002; Soltis et Soltis 1993; Wolfe 2001). L'appariement

chromosomique peut ne pas être strictement préférentiel chez les allotétraploïdes, de sorte que des recombinaisons entre chromosomes homéologues homogénéisent le génome (Sybenga 1996). Ces changements de mode de ségrégation peuvent avoir lieu sur plusieurs générations et se caractérisent par une ségrégation intermédiaire (Stift, *et al.* 2008).

V.3.2 L'effet de l'hybridation somatique sur le comportement méiotique

Différentes figures méiotiques, incluant des appariements entre chromosomes homéologues ou la formation de multivalents, ont été observées chez des hybrides somatiques de pomme de terre, tomate et de tournesol (Binsfeld, *et al.* 2001; Conicella, *et al.* 1997; Gavrilenko, *et al.* 2001; Pijnacker, *et al.* 1992). Chez l'hybride somatique WLM+EUR en plus des bivalents majoritairement formés, des monovalents et multivalents ont également été observés. Le taux de tétravalents formés (11%) laisse penser à un faible taux de gamètes issus de double réduction (gamètes contenant deux chromatides sœurs). Ces structures multivalentes sont généralement considérées comme responsables de la formation de micropollen. Ces observations sont en accord avec celles rapportées dans deux études (Chen, *et al.* 2004; Del Bosco, *et al.* 1999) chez d'autres hybrides somatiques d'agrumes. Lors de la méiose, l'analyse de l'appariement chromosomique est la manière classique pour évaluer la distance entre espèces ainsi que la stabilité génétique des polyploïdes utilisés dans les programmes d'amélioration (Chen, *et al.* 2004).

Le comportement méiotique de WLM+EUR peut être indicatif d'homologie inter génomique entre WLM et EUR. En effet, les deux parents diploïdes WLM et EUR sont sexuellement compatibles. De plus, EUR (*C. limon*) est présumé être un hybride de *C. medica* et *C. aurantium*, ce dernier étant, à son tour, le produit d'un croisement entre *C. maxima* et *C. reticulata* (Nicolosi, *et al.* 2000).

Le comportement méiotique d'un hybride somatique intergénérique d'agrumes se caractérise par un fort taux de bivalents formés (Chen, *et al.* 2004) indicatif d'une faible homologie chromosomique. De mêmes observations ont été réalisées chez un hybride intergénérique doublé entre *Lycopersicum esculentum* et *Solanum sitiens* (Ji, *et al.* 2004) caractérisées par un taux élevé de bivalents formés entre chromosomes homologues. En effet, la fréquence d'appariement méiotique entre chromosomes homologues est proche de 1 et est nulle entre chromosomes homéologues chez les allopolyploïdes extrêmes (Contreras, *et al.* 2007).

En général, le comportement méiotique des polyploïdes suit un modèle combinant les comportements des allopolyploïdes et des autopolyploïdes. Ainsi il existe une multitude de comportements méiotiques intermédiaires qui combinent la formation de bivalents et de

multivalents (Stebbins 1950; Wu, *et al.* 2001). Plusieurs études cytogénétiques et moléculaires suggèrent que plusieurs polyploïdes, comme *Oncorhynchus mykiss* et *Lotus corniculatus* suivent un tel comportement méiotique (Allendorf et Danzmann 1997; Fjellstrom, *et al.* 2001; Sybenga 1996). Ce comportement indique que les chromosomes parentaux sont suffisamment semblables pour s'apparier mais pas assez pour un bon déroulement de gamétogenèse (Contreras, *et al.* 2007). En effet, la fertilité chez les allopolyploïdes issus de parents proches devrait être faible suite à la formation de multivalents. Cependant la fertilité des allopolyploïdes extrêmes devrait être plus importante suite à un appariement préférentiel entre chromosomes homologues et une ségrégation disomique (Wu, *et al.* 2001). Les différentes configurations possibles lors de l'appariement méiotique ont été modélisées mathématiquement en utilisant un facteur d'appariement préférentiel p (Wu, *et al.* 2001).

Afin d'identifier le mode de ségrégation de ces hybrides somatiques, l'étude cytogénétique reste insuffisante. En effet, ni la formation de multivalents dans un autotétraploïde ni celle de bivalents dans un allotétraploïde ne sont strictement obligatoires (Soltis et Riesberg 1986; Watson, *et al.* 1991). De plus, une ségrégation tétrasomique peut être associée à la formation exclusive de bivalents durant la méiose, comme observé pour un tétraploïde de lotier *Lotus corniculatus* (Fjellstrom, *et al.* 2001), un tétraploïde de *Vaccinium corymbosum* (Qu, *et al.* 1998) et un autotétraploïde de *Brassica oleracea* (Jenczewski, *et al.* 2002). Par conséquent, les analyses génétiques, à l'aide de marqueurs moléculaires, de populations ségrégeantes restent indispensables à l'évaluation du mode de transmission allélique.

V.3.3 L'identification du mode de ségrégation allélique chez les hybrides somatiques interspécifiques et intergénériques d'agrumes

L'analyse de la ségrégation allélique a été conduite sur 2 populations ségrégeante, l'une étant issue d'un croisement entre pamplemoussier et un hybride somatique interspécifique WLM + EUR, l'autre entre un pamplemoussier et un hybride somatique intergénérique WLM + PON. 17 et 19 marqueurs SSR polymorphes ont été sélectionnés pour l'étude de la ségrégation chez ces deux populations respectives. Afin d'estimer les paramètres de ségrégation les plus proches des données observées, une approche, basée sur le calcul d'une probabilité de vraisemblance, développée récemment (Stift, *et al.* 2008) a été appliquée. Ce modèle d'analyse statistique a permis d'incorporer l'hypothèse de ségrégation disomique,

tétrasomique et une multitude d'hypothèses intermédiaires. De plus cette méthode permet aussi d'évaluer les taux de double réduction.

Sur la population triploïde issue du croisement CHA X WLM+EUR, des distorsions de ségrégation allélique significatives ont été observées sur dix des dix-sept marqueurs étudiés en négligeant la possibilité d'allèles nuls. Le citronnier EUR présente un profil homozygote au niveau de ces dix marqueurs laissant suspecter la possibilité d'un allèle nul. En effet, EUR ne présentait pas les allèles respectifs issus de ses parents présumés au niveau de ses loci. Le citronnier étant un hybride naturel de *Citrus medica* L. et *Citrus aurantium* lui même hybride de *Citrus maxima* et *Citrus reticulata* (Nicolosi, *et al.* 2000). La présence d'allèles nuls fait apparaître un diploïde hétérozygote en homozygote et mène ainsi à des estimations biaisées dans les études de génétique des populations (Oddou-Muratorio, *et al.* 2009). De plus, aucune distorsion allélique significative n'a été observée en considérant la présence d'allèles nuls chez EUR. Cette hypothèse a été approuvée par l'analyse des parents putatifs du citronnier (*C. aurantium* et *C. medica*) le mélange des ADN de ses parents qui a mis en évidence la compétition d'amplification allélique entre les allèles des parents de citronnier.

Les résultats obtenus suite à l'analyse par les marqueurs SSR ont écarté la possibilité d'une ségrégation disomique au niveau des loci étudiés. Une hypothèse de ségrégation intermédiaire est significativement plus adaptée aux données observées pour huit des dix-sept loci étudiés. Cependant, une hypothèse de ségrégation tétrasomique explique de manière significative les proportions génotypiques observées, au niveau des neuf loci restants, dans la descendance du croisement étudié.

Dix-neuf marqueurs SSR polymorphes, placés sur 9 groupes de liaisons d'une carte génétique de clémentinier (Ollitrault, *et al.* 2011) ont été utilisés pour l'évaluation du mode ségrégation allélique d'un hybride somatique intergénérique WLM+PON. L'analyse des disparités alléliques, dans la descendance du croisement CHA X WLM+PON, au niveau des différents marqueurs utilisés a mis en évidence des distorsions alléliques significatives au niveau de trois des dix-neuf marqueurs utilisés. Ces distorsions n'étaient pas dues à la présence d'allèles nuls. Elles peuvent être causées par des gènes d'incompatibilité, de la compétition gamétique, des avortements zygotiques ou une fertilisation préférentielle (Lyttle 1991; Ruiz et Asins 2003). En effet, des distorsions de ségrégation ont souvent été observées chez les agrumes dans les croisements intergénériques (Durham, *et al.* 1992; Jarrell, *et al.* 1992; Ruiz et Asins 2003; Torres, *et al.* 1978). Ces trois marqueurs ont été écartés de l'analyse.

L'analyse génétique de la descendance triploïde du croisement CHA X WLM+PON a conforté l'hypothèse d'une ségrégation intermédiaire (à tendance disomique) chez cet hybride

au niveau des 16 marqueurs utilisés. Les proportions de gamètes formés par appariement chromosomique aléatoire au niveau des marqueurs situés sur un même groupe de liaison sont similaires. Cependant, la proportion de gamètes formés suite à une ségrégation tétrasomique varie fortement d'un groupe de liaison à un autre. Ce résultat pourrait être indicatif de différents niveaux d'homologie génétique entre mandarinier et *Poncirus* tout au long des 9 groupes de liaison étudiés.

Ainsi, chez l'hybride somatique interspécifique, neuf marqueurs ont présenté une ségrégation tétrasomique et huit, une ségrégation intermédiaire tandis que chez l'hybride somatique intergénérique, les seize marqueurs ont montré une ségrégation intermédiaire à tendance disomique. Par conséquent, avec l'accroissement de la distance génétique entre les 2 parents des hybrides somatiques, l'homologie entre chromosome homologue décroît, entraînant la ségrégation vers une forme plus disomique.

L'évaluation du mode de ségrégation chez les polyploïdes a souvent été réalisée via Test du χ^2 ou analyse bayésienne (Bousalem, *et al.* 2006; Olson 1997). Cependant ces deux méthodes d'analyse permettent de comparer deux hypothèses de ségrégation strictes et n'accordent aucune considération aux possibilités de ségrégation intermédiaire. Cette approche analytique utilisée dans cette étude et développée par Stift *et al.* (2008) a ainsi permis d'établir qu'une ségrégation intermédiaire est plus probable qu'une ségrégation tétrasomique chez un tétraploïde de *Centaurea jacea* et un tétraploïde de *Tolmiea menziesii* (Hardy et Vekemans 2001; Soltis et Soltis 1988). En effet dans ces deux publications, l'hypothèse d'une ségrégation intermédiaire ne pouvait pas être écartée en utilisant les méthodes d'analyses conventionnelles (Stift, *et al.* 2008).

V.3.4 Impact du type d'hybridation somatique sur la transmission de l'hétérozygotie et la double réduction

La transmission de l'hétérozygotie parentale est influencée par le mode de ségrégation adopté par l'hybride somatique. Elle dépend du type d'appariement chromosomique ayant lieu. En effet, en cas de ségrégation intermédiaire, les hétérozygoties inter et intraparentales sont transmises. Cependant, le taux de restitution de l'hétérozygotie intraparentale augmente avec un taux croissant de gamètes formés par appariement chromosomiques aléatoires. Ainsi chez l'hybride somatique interspécifique, une restitution intraparentale est favorisée au dépend de l'interparentale tandis que chez l'hybride somatique intergénérique la transmission de l'hétérozygotie interparentale est favorisée au dépend de l'intraparentale.

La connaissance de la restitution de l'hétérozygotie est importante pour les stratégies d'amélioration des agrumes basées sur l'induction de variabilité génétique suivie de processus de sélection. En effet, lors de ce type de croisement, pour chaque locus, le nombre maximal de structures alléliques possibles variera de 8 en cas de ségrégation disomique à 20 en cas de ségrégation tétrasomique (Ollitrault, *et al.* 2008). Chez un hybride somatique interspécifique, caractérisé par une ségrégation tétrasomique et intermédiaire à tendance tétrasomique, les hétérozygoties inter et intraparentale sont transmises. Ainsi, la transmission de l'hétérozygotie intraparentale sera favorisée dans les descendances des croisements 2x X 4x impliquant un hybride somatique interspécifique, menant ainsi à une plus grande diversité génétique et la ségrégation de caractères parentaux intéressants chez les populations triploïdes générées. Chez un hybride intergénérique, l'éloignement génétique observé est suffisant pour conduire à un appariement préférentiel des chromosomes homologues et ainsi à la transmission prédominante de l'hétérozygotie interparentale aux descendances générées. Ainsi, si des caractères d'intérêt sont homozygotes dominants, ils seront transmis à haute fréquence aux populations générées par un hybride somatique intergénérique. Par ailleurs, si les parents sont hétérozygotes pour ces caractères, une ségrégation devrait avoir lieu et l'utilisation de la stratégie « Tetrazyg » (Grosser et Gmitter 2010) nécessitera une optimisation des processus de sélection.

L'approche utilisée a permis, aussi, d'estimer les taux de doubles réductions ayant lieu lors de la gamétogenèse. La double réduction peut jouer un rôle important dans la purge des mutations délétères via une sélection gamétophytique (Butruille et Boiteux 2000). La double réduction a lieu quand les chromatides sœurs migrent au sein d'un même gamète à la méiose. Elle nécessite la formation de multivalents lors de la méiose, de la fréquence de recombinaisons ainsi que la position du locus étudié par rapport au centromère (Stift, *et al.* 2008). Par conséquent, une plus grande accumulation de mutations délétères devrait se produire lors d'une ségrégation de type tétrasomique.

Au niveau interspécifique, aucun génotype gamétique issu de double réduction n'a été observé au niveau des marqueurs ne présentant aucun allèle en commun entre les parents. Les mêmes résultats ont été observés chez les autres marqueurs étudiés au niveau des allèles non communs. Par ailleurs, l'identification des génotypes double réduits au niveau des loci présentant des allèles communs et lors de la présence d'allèles nuls, n'était pas réalisable. Ces résultats sont en accord avec les observations cytogénétiques qui ont mis en évidence la faible formation de structures de type multivalent lors de la méiose. Au niveau intergénérique, des génotypes gamétiques issus de double réduction stricte ont été observés, à faible taux, au

niveau de plusieurs marqueurs. Cependant, les taux de double réduction estimés sont plus élevés que les taux observés mais restent, toutefois, plus proches du minimum théorique que du maximum. Cette tendance est logique puisque les génotypes doubles réduits ne sont pas complètement identifiés au niveau des loci partiellement hétérozygotes. Ces résultats sont en accord avec les observations cytogénétiques réalisées par Chen *et al.* (2004) sur un hybride somatique intergénérique entre mandarinier Cléopatre et Poncirus Argentine.

Le comportement méiotique ainsi que la ségrégation allélique chez les hybrides somatiques d'agrumes dépendent de la distance génétique reliant les parents diploïdes utilisés. Assurément, plus ces parents sont proches, plus l'appariement chromosomique aura de chances d'avoir lieu entre chromosomes « homéologues » et la ségrégation tendra vers la tétrasomie.

VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Durant ce travail de thèse, nous avons étudié l'impact de l'hybridation somatique sur la morphologie florale, la fertilité, la transmission de l'apomixie et la monoembryonie, la ségrégation allélique et l'origine génétique des variations du niveau de ploïdie dans les descendance lors de croisements interploïdaux impliquant ces hybrides somatiques.

Le matériel expérimental utilisé a été caractérisé au niveau nucléaire à l'aide de marqueurs de type SSR. La caractérisation moléculaire a mis en évidence l'addition des génomes parentaux au sein de chacun des hybrides somatiques étudiés. Sept hybrides somatiques ont été choisis pour l'étude de la biologie de la reproduction chez les hybrides somatiques d'agrumes. Pour l'étude de la ségrégation allélique, deux populations ont été créées en croisant des fleurs de pamplemoussier avec du pollen de deux hybrides somatiques : interspécifique (mandarinier + citronnier) et intergénérique (mandarinier + poncirus). Enfin, des variations du niveau de ploïdie dans des descendance de trois croisements de type $2x \times 4x$ ont été observées et leurs origines ont été évaluées.

VI.1 BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION DES HYBRIDES SOMATIQUES D'AGRUMES

VI.1.1 Effets de l'hybridation somatique sur l'appareil floral

L'étude de l'appareil floral des parents des différents hybrides somatiques étudiés montre de fortes différences. Les hybrides somatiques présentent dans l'ensemble plusieurs caractéristiques phénotypiques intermédiaires aux parents diploïdes. Toutefois, des phénomènes de dominances des caractères floraux du second parent, dans les hybrides somatiques impliquant la mandarine, et du pomelo chez les hybrides somatiques l'impliquant ont été observés.

Ces hybrides somatiques ont donné naissance à des phénotypes intermédiaires aux deux parents mais également de nouveaux, au-delà des deux parents. Ainsi, les relations phénotypiques florales ne peuvent pas être analysées que par une simple hypothèse d'additivité. Ces phénotypes supérieurs aux deux parents diploïdes peuvent être dus à la polyploïdisation ou à une expression transgressive des gènes. De plus, une augmentation du

volume cellulaire se traduit par la formation d'organes végétatifs et reproductifs plus volumineux que chez les parents diploïdes.

VI.1.2 Impact de l'hybridation somatique sur la fertilité

La fertilité des hybrides somatiques varie d'un hybride à l'autre. Elle est intermédiaire à la fertilité parentale pour certains ou alors identique au parent le moins fertile.

Au niveau pollinique, les différents hybrides somatiques ont donné naissance à un pollen viable à taux de germination généralement intermédiaire aux parents diploïdes. Contrairement aux hybrides somatiques chez d'autres espèces, les hybrides somatiques d'agrumes présentent un pollen viable et fertile au niveau interspécifique comme au niveau intergénérique. Ce résultat est dû à une forte homologie intergénomique entre les différentes espèces du genre *Citrus* et *Poncirus* mais aussi la compatibilité sexuelle entre ces deux genres.

L'étude de la fertilité mâle et femelle d'hybrides somatiques entre parents plus éloignés serait très intéressante et permettrait d'avoir une idée sur le seuil d'homologie et compatibilité génomiques au-delà du niveau intergénérique.

VI.1.3 Transmission de l'apomixie et de la poly-monoembryonie

L'étude de la transmission de l'apomixie et de la mono/polyembryonie chez les hybrides somatiques est complexe. Certains hybrides somatiques ont présenté, des taux de polyembryonie et de plants d'origine zygotique, très différents de ceux de leurs parents diploïdes alors que d'autres sont très proches des parents. Il sera particulièrement important de tenir compte de ce résultat pour les programmes d'amélioration des variétés et de porte-greffe. Les hybrides somatiques présentant un fort taux de zygote dans leurs descendance pourront être utilisés en tant que géniteurs femelles dans les plans de croisements mais ces mêmes hybrides ne pourront pas être multipliés par voie nucellaire pour la propagation de porte-greffe.

Un modèle de transmission de ces deux caractères, basé sur de précédents travaux, a été mis en place. Ce modèle suggère que ces deux caractères soient contrôlés, indépendamment, par deux gènes complémentaires, *A* ; *B* pour l'apomixie et *C* et *D* pour la mono/polyembryonie, qui doivent être représentés par leurs allèles dominants chez un diploïde pour induire l'apomixie et la polyembryonie. Au niveau polyploïde, les ratios alléliques *B/A* et *D/C* influenceraient l'expression de ces deux phénotypes.

A ce stade et avec les résultats obtenus, ce modèle ne peut être complètement validé. En effet, notre étude n'a pas traité l'ensemble des facteurs pouvant intervenir dans la modification de

l'expression génétique chez les polyploïdes, tels que les variations épigénétiques, les conditions écophysiologiques ou un possible effet pollinisateur. Il faudrait pouvoir compléter cette étude avec la réalisation de croisements diallèles contrôlés, en agrandissant le nombre d'hybrides somatiques, sous des conditions climatiques différentes, suivies d'une analyse génétique approfondie des populations obtenues et de l'étude structurale génétique comparative des hybrides somatiques et de leurs parents diploïdes.

VI.2 ORIGINE GENETIQUE DES 2X, 3X ET 4X DANS LES DESCENDANCES 2X X 4X

La majorité des hybrides issus des croisements 2x x 4x sont triploïdes. Cependant dans trois croisements, des diploïdes et tétraploïdes ont également été obtenus. L'analyse à l'aide de marqueurs moléculaires montre que les triploïdes sont bien issus de la fécondation d'un gamète femelle haploïde par un pollen diploïde. Les tétraploïdes proviennent de la fécondation de gamètes femelles avec des gamètes d'hybrides somatiques. Les diploïdes issus des croisements EUR x SRG+COC et EUR x MEL+SHO se sont révélés être d'origine nucellaire tandis que les diploïdes obtenus dans le croisement FOM x WLM+SRG sont d'origine zygotique. En effet, ces diploïdes ont été analysés à l'aide de marqueurs localisés sur 8 des 9 groupes de liaison de la carte génétique de clémentinier (Ollitrault, *et al.* 2011). Ils ont présenté des allèles des mandariniers Fortune et Willowleaf ou du Pomelo Star Ruby à différents loci. De ce fait, l'hybride somatique WLM+SGR est capable de produire des gamètes haploïdes viables. En revanche, aucune corrélation ne pouvait être établie avec la production de micropollen par cet hybride. En effet, l'ensemble des hybrides somatiques étudiés se caractérisait par des taux de micropollen supérieurs à leurs parents diploïdes.

VI.2.1 Perspectives pour les programmes d'amélioration d'agrumes

L'étude d'un plus grand nombre d'hybrides somatiques d'agrumes, en pollinisation contrôlée et l'utilisation de plusieurs pollinisateurs, permettrait de comprendre mieux l'expression et la transmission de l'apomixie et de la mono/polyembryonie chez les agrumes. Le matériel végétal créé par le CIRAD, et en particulier les hybrides somatiques allotétraploïdes créés suivant un plan d'hybridation diallèle entre 5 espèces du genre *Citrus* et ceux issus d'une addition entre mandarinier cv "Willowleaf" et 7 espèces appartenant aux genres *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella*, apparaît particulièrement adapté à ce type d'études. L'étude

génomique, génétique et structurelle, des espèces parentales pourrait être très utile pour la prédiction du phénotype des hybrides somatiques et de leurs descendance.

De plus, l'évaluation de la polyembryonie/zygotie dans des graines issues des parents diploïdes doublés serait un atout important pour cette étude. Il permettrait d'appréhender l'effet de la ploïdie sur le nombre d'embryons et de zygotes.

Les résultats obtenus ont mis en évidence deux hybrides somatiques WLM+SRG et WLM+SHO qui se caractérisent par une polyembryonie réduite et un fort taux de plants zygotiques en descendance. Ces caractéristiques sont recherchées pour les programmes de création variétale. Ces deux hybrides somatiques sont d'ores et déjà utilisés en tant que parent mâle dans le programme de création variétale du CIRAD à San Giuliano. Ils pourront ainsi intégrer le programme de création variétale, en tant que parent femelle utilisable dans des croisements de type $4x \times 2x$, connus pour être plus intéressants en terme de rentabilité, en nombre de triploïdes générés, que les croisements $2x \times 4x$.

Cependant, un tel comportement chez des hybrides somatiques peut représenter une problématique pour les programmes de polyploïdisation liés à la création de porte-greffe. En contradiction avec la majorité des espèces végétales, la polyploïdie chez les agrumes paraît agir négativement sur la polyembryonie et l'apomixie, caractéristiques essentielles pour un porte-greffe. Il serait donc important de tester les hybrides somatiques et tous les diploïdes doublés potentiellement utiles en tant que porte-greffe.

L'apparition d'individus diploïdes dans la descendance du croisement FOM \times WLM+SRG indique un déroulement anormal de la méiose chez cet hybride somatique. Il serait donc important de réaliser une étude cytogénétique fine de cet hybride somatique. L'utilisation de technique d'évaluation de la ploïdie de grains de pollen par cytométrie en flux (Pan, *et al.* 2004) permettrait d'avoir une idée précise des différents niveaux de ploïdie pollinique chez les hybrides somatiques. Il serait également intéressant d'étudier le comportement méiotique de cet hybride somatique par des techniques de type GISH ou FISH pour une meilleure évaluation de son comportement méiotique.

VI.3 ETUDE DE LA SEGREGATION ALLELIQUE CHEZ LES HYBRIDES SOMATIQUES D'AGRUMES

VI.3.1 Analyse cytogénétique et étude du mode de ségrégation allélique

Chez les hybrides somatiques, la relation entre les génomes parentaux exerce une forte influence sur la détermination des processus d'appariement chromosomique et de recombinaison. Ainsi, elle pourrait influencer l'étendue des irrégularités méiotiques et par ailleurs, la viabilité des gamètes.

Au niveau interspécifique, chez l'hybride somatique entre mandarinier et citronnier et malgré la formation majoritaire de bivalents observée (78%), des structures de type tétravalents (11%) et univalents (8%) ont été observées. La présence de ces derniers, généralement responsables de la formation de micropollen, est souvent négativement corrélée à la viabilité pollinique. La formation de multivalents au niveau de notre hybride somatique est révélatrice d'homologie chromosomique entre mandarinier et citronnier. Cependant, au niveau intergénérique, ce taux de micropollen était significativement plus faible (Chen, *et al.* 2004). Ce résultat est indicatif d'un faible taux d'univalents. En effet, l'étude cytogénétique d'un hybride somatique intergénérique entre mandarine cv Cléopâtre et poncirus cv Argentine a révélé un fort pourcentage de bivalents, indicatif d'une moindre homologie génomique au niveau intergénérique. Ces comportements méiotiques peuvent être liés à la large compatibilité sexuelle chez les agrumes.

L'utilisation de marqueurs SSR polymorphes a été d'une grande utilité pour l'identification des modes de ségrégation allélique chez les hybrides somatiques d'agrumes. Afin de traiter nos résultats, nous avons utilisé l'approche développée par Stift *et al.* (2008) qui permet d'évaluer les taux de double réductions et de prendre en compte les modèles de ségrégation intermédiaires. Des distorsions de ségrégations au niveau de certains marqueurs, au niveau interspécifique, ont été clairement observées. Ces distorsions alléliques, probablement dues à une compétition allélique entre les allèles parentaux du citronnier Eureka, disparaissent après la considération de présence d'allèles nuls chez le citronnier. Toutefois, au niveau intergénérique, ces distorsions de ségrégation seraient dues à une compétition gamétique, une fécondation préférentielle ou à la présence de gènes d'incompatibilité à ces loci. La considération d'allèles nuls à ce niveau n'était pas compatible avec les résultats obtenus.

L'approche utilisée a permis de prendre en considération, en plus des hypothèses de ségrégation disomique et tétrasomique, un ensemble d'hypothèses de ségrégation intermédiaire. Ainsi les analyses des descendance ont clairement montré une ségrégation tétrasomique et intermédiaire à tendance tétrasomique au niveau des loci étudiés pour l'hybride somatique interspécifique WLM+EUR. Cependant la ségrégation est de type intermédiaire à tendance disomique pour l'hybride somatique intergénérique WLM+PON, au niveau des 9 groupes de liaisons étudiés.

De plus, chez l'hybride somatique WLM+EUR, au niveau des loci à ségrégation intermédiaire, l'appariement chromosomique préférentiel a majoritairement lieu entre chromosomes homéologues. Cependant, chez WLM+PON l'appariement chromosomique préférentiel a lieu entre chromosomes homologues. Ces résultats montrent que les hybrides somatiques d'agrumes adoptent un mode de ségrégation intermédiaire, dû à la proximité phylogénique des parents et à l'importante compatibilité sexuelle qui existe au sein des agrumes.

La transmission de l'hétérozygotie intraparentale est également liée au mode de ségrégation allélique. En effet, celle ci est positivement corrélée au taux de gamètes formés par ségrégation tétrasomique. Par conséquent, un hybride somatique interspécifique favorise plus la transmission de l'hétérozygotie intraparentale qu'un hybride somatique intergénérique.

L'existence de modes de ségrégation intermédiaire peut avoir des répercussions importantes sur les études de génétique des populations et la cartographie génétique des tétraploïdes. Chez les agrumes, les hybrides somatiques peuvent manifester différents modes d'appariements chromosomiques, en fonction de l'homologie génétique au niveau du locus en question. Ainsi, les différentes méthodes développées pour la génétique des populations ou l'établissement de cartes de liaisons génétiques chez les tétraploïdes (Cao, *et al.* 2005; Luo, *et al.* 2006; Ronfort, *et al.* 1998) ne peuvent être généralement applicables à des systèmes à large compatibilité sexuelle.

VI.3.2 Perspectives d'études génétiques et épigénétiques chez les hybrides somatiques d'agrumes et leurs descendance

Nos résultats ont montré une ségrégation intermédiaire et tétrasomique pour l'hybride somatique interspécifique et intermédiaire à tendance disomique chez l'hybride intergénérique. L'hybride somatique interspécifique permet de transmettre l'hétérozygotie inter et intraparentale via un appariement aléatoire des chromosomes ou appariement

préférentiel entre chromosomes homéologues lors de la méiose. Ce type de configuration permet ainsi d'augmenter la diversité et variabilité allélique dans les descendances des hybrides somatiques interspécifiques. Il serait intéressant de vérifier sur des populations en ségrégation que la cette diversité allélique se retrouve au niveau phénotypique. Ces résultats, une fois généralisés sur l'ensemble des hybrides somatiques interspécifiques obtenus, permettraient de raisonner les tailles de populations pour la conduite d'un programme de sélection.

Au niveau intergénérique, l'appariement préférentiel a lieu entre chromosomes homologues impliquant ainsi la transmission de l'hétérozygotie interparentale au dépend de l'intraparentale. Ce résultat est dû à l'éloignement génétique au niveau intergénérique. Ainsi, si les parents d'un hybride somatique intergénérique sont homozygotes pour des caractères dominants, ces derniers seront majoritairement transmis aux descendances des hybrides somatiques. En revanche, si ces caractères sont hétérozygotes, ces caractères ségrégeront et nécessiteront l'utilisation de stratégie « tetrazyg » (Grosser et Gmitter 2010).

Il serait intéressant d'étudier par la suite des hybrides somatiques dont les parents ont une compatibilité sexuelle très faible ou nulle afin d'établir ou non une corrélation avec le mode de ségrégation. On partirait alors de l'hypothèse que la compatibilité sexuelle chez les agrumes pourrait être liée à la non reconnaissance des chromosomes homéologues entraînant alors une ségrégation disomique chez un hybride somatique.

Suite à des événements de polyploïdisation, plusieurs études ont mis en évidence des changements génétiques et épigénétiques ayant lieu assez rapidement. Ces études ont montré que, au niveau génomique, les polyploïdes tendent vers un retour à la diploïdie via la réduction et la perte de gènes dupliqués (Chen, *et al.* 2007; Grover, *et al.* 2007; Wolfe 2001). Chez les allopolyploïdes, la perte de fragments d'ADN semble avoir lieu via des recombinaisons entre chromosomes homéologues (Gaeta, *et al.* 2007; Ozkan, *et al.* 2002).

Dans certains cas, ces événements sont associés à une modification de l'expression de gènes et de phénotypes. Des analyses RFLP et AFLP réalisées sur des allopolyploïdes de *Brassica* (Song, *et al.* 1995) et de *Triticum* (Liu, *et al.* 1998; Ozkan, *et al.* 2001; Shaked, *et al.* 2001) ont mis en évidence des pertes et rajouts de fragments d'ADN immédiatement après la polyploïdisation. La polyploïdie peut également entraîner des réarrangements ou des pertes chromosomiques (Levy et Feldman 2004; Pires, *et al.* 2004; Song, *et al.* 1995; Udall et Wendel 2006), une inégalité de l'évolution des séquences de gènes dupliqués (Adams 2007) ou des variations des taux de méthylation génomiques (Lukens, *et al.* 2006; Madlung, *et al.* 2002; Salmon, *et al.* 2005). Le mécanisme exact responsable de cette réduction est encore mal

connu. En effet, relativement peu de choses sont connus sur ces changements de structure et d'expression pendant les premières générations suivant la polyploïdisation. Ce constat est principalement dû à la rareté de jeunes polyploïdes naturels pour lesquels les ressources génétiques sont disponibles.

Chez les agrumes, la disponibilité de matériel végétal polyploïde jeune ainsi que des outils d'études moléculaires permettraient une étude approfondie de cette évolution. Il serait donc très intéressant 1) d'examiner l'évolution, de manière rapide, de gènes homéologues au niveau des premières descendances de divers hybrides somatiques interspécifiques et intergénériques, 2) d'étudier le polymorphisme entre chromosomes homéologues au niveau nucléotidique via des marqueurs SNP, 3) de vérifier si des modifications structurelles ont lieu de manière rapide (directement suite à la polyploïdisation) ou nécessitent plus de temps et enfin examiner la possibilité de l'existence de motifs répétés de perte ou de silencing indépendamment de l'origine. L'utilisation de marqueurs de type SNP ou de techniques de pyrosequençage serait un excellent atout pour ce genre d'étude.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams KL (2007) Evolution of Duplicate Gene Expression in Polyploid and Hybrid Plants. *Journal of Heredity* 98:136-141

Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF (2003) Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *PNAS* 100:4649-4654

Adams KL, Percifield R, Wendel JF (2004) Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics* 168:2217-2226

Albertin W, Alix K, Balliau T, Brabant P, Davanture M, Malosse C, Valot B, Thiellement H (2007) Differential regulation of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids is not related to protein function nor subcellular localization. *BMC genomics* 8:56

Alexander M (1980) A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol* 55:

Aleza P, Cuenca J, Juárez J, Pina JA, Navarro L (2010) 'Garbí'Mandarin: A New Late-maturing Triploid Hybrid. *HortScience* 45:139-141

Aleza P, Juárez J, Ollitrault P, Navarro L (2009) Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. *Plant cell reports* 28:1837-1846

Allendorf FW, Danzmann RG (1997) Secondary Tetrasomic Segregation of MDH-B and Preferential Pairing of Homeologues in Rainbow Trout. *Genetics* 145:1083-1092

Alonzo G, Del Bosco SF, Palazzolo E, Saiano F, Tusa N (2000) Citrus somatic hybrid leaf essential oil. *Flavour and Fragrance Journal* 15:258-262

Asíns MJ, Garcia MR, Ruiz C, Carbonell EA (2002) Molecular markers for the genetic analysis of apomixis. In: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (eds) *Molecular techniques in crop improvement* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 266-281

Aubert B, Vullin G (1997) Citrus nurseries and planting techniques. 184

Avivi L (1976) The effect of genes controlling different degrees of homoeologous pairing on quadrivalent frequency in induced autotetraploid lines of *Triticum longissimum*. *Genome* 18:357-364

Barcaccia, G, Tavoletti, S, Falcinelli, M, Veronesi, F (1997) Environmental influences on the frequency and viability of meiotic and apomeiotic cells of a diploid mutant of alfalfa. *Crop Science Society of America, Madison, WI, ETATS-UNIS*

- Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT** (2006) Assessing genetic diversity and population structure in a *citrus* germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). TAG Theoretical and Applied Genetics 112:1519-1531
- Barone A, Li J, Sebastiano A, Cardi T, Frusciante L** (2002) Evidence for tetrasomic inheritance in a tetraploid *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrid through the use of molecular markers. TAG Theoretical and Applied Genetics 104:539-546
- Barrett H** (1974) colchicine-induced polyploidy in citrus. Botanical Gazette 135:29-41
- Barrett H, Rhodes A** (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. Systematic Botany 1:105-136
- Barsby TL, Chuong PV, Yarrow SA, Wu SC, Coumans M, Kemble RJ, Powell AD, Beversdorf WD, Pauls KP** (1987) The combination of Polima CMS and cytoplasmic triazine resistance in Brassica napus. Theoretical and Applied Genetics 73:809-814
- Bassene JB, Berti L, Carcouet E, Dhuique-Mayer C, Fanciullino AL, Bouffin J, Ollitrault P, Froelicher Y** (2008) Influence of mitochondria origin on fruit quality in a citrus cybrid. J Agric Food Chem 56:8635-8640
- Bassene JB, Berti L, Costantino G, Carcouet E, Kamiri M, Tomi F, Dambier D, Ollitrault P, Froelicher Y** (2009a) Inheritance of characters involved in fruit quality in a citrus interspecific allotetraploid somatic hybrid. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57:5065-5070
- Bassene JB, Froelicher Y, Dhuique-Mayer C, Mouhaya W, Ferrer RM, Ancillo G, Morillon R, Navarro L, Ollitrault P** (2009b) Non-additive phenotypic and transcriptomic inheritance in a citrus allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* and *C. limon*: the case of pulp carotenoid biosynthesis pathway. Plant Cell Reports 28:1689-1697
- Bassene JB, Froelicher Y, Dubois C, Ferrer RM, Navarro L, Ollitrault P, Ancillo G** (2010) Non-additive gene regulation in a citrus allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* Blanco and *C. limon* (L.) Burm. Heredity 105:299-308
- Bayer RJ, Mabberley DJ, Morton C, Miller CH, Sharma IK, Pfeil BE, Rich S, Hitchcock R, Sykes S** (2009) A molecular phylogeny of the orange subfamily (*Rutaceae*: *Aurantioideae*) using nine cpDNA sequences. Journal of Botany 96:668-685
- Beidler JL, Hilliard PR, Rill RL** (1982) Ultrasensitive Staining of Nucleic-Acids with Silver. Analytical Biochemistry 126:374-380
- Bhojwani SS, Razdan MK** (1996) Plant tissue culture: theory and practice. Elsevier Science Ltd

- Binsfeld PC, Schnabl H** (2002) Molecular and cytogenetic constitution of plants obtained via two different somatic hybridization methods. *Plant Cell Reports* 21:58-62
- Binsfeld PC, Wingender R, Schnabl H** (2001) Cytogenetic analysis of interspecific sunflower hybrids and molecular evaluation of their progeny. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 102:1280-1285
- Bona CM, Gould JH, Miller Jr JC, Stelly D, Louzada ES** (2009) Citrus asymmetric somatic hybrids produced via fusion of gamma-irradiated and iodoacetamide-treated protoplasts. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44:454-462
- Bousalem M, Arnau G, Hochu I, Arnolin R, Viader V, Santoni S, David J** (2006) Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American *yam Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the *Dioscoreae*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 113:439-451
- Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM** (1989) Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1:37-52
- Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM** (1991) Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. In, pp 1-20
- Briggs D, Walters SM** (1997) *Plant variation and evolution*. Cambridge Univ Pr
- Brochmann C, Brysting AK, Alsos IG, Borgen L, Grundt HH, Scheen AC, Elven R** (2004) Polyploidy in arctic plants. In: *Biological relevance of polyploidy: ecology to genomics The International Polploidy Conference, The Linnean Society of London and the Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 27-30 April, 2003*, pp 521-536
- Buteler M, Jarret R, LaBonte D** (1999) Sequence characterization of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 99:123-132
- Butruille DV, Boiteux LS** (2000) Selection-mutation balance in polysomic tetraploids: Impact of double reduction and gametophytic selection on the frequency and subchromosomal localization of deleterious mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:6608-6613
- Cai X, Xu SS** (2007) Meiosis-driven genome variation in plants. *Current Genomics* 8:151-161
- Cai XD, Fu J, Deng XX, Guo WW** (2007) Production and molecular characterization of potential seedless cybrid plants between pollen sterile Satsuma mandarin and two seedy Citrus cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90:275-283
- Cameron J, W., Garber MJ** (1968) Identical-twin hybrids of Citrus x Poncirus from strictly sexual seed parents

American Journal of Botany 55:199-205

Cameron J, W., Soost RK (1980) Mono and polyembryony among tetraploid Citrus hybrids. HortScience 15:730-731

Cameron JW, Frost HB (1968) Genetics, breeding, and nucellar embryony. In: REUTHER, W, BATCHELOR, LD & WEBBER, HJ, eds The citrus industry, University of California - Division of Agricultural Science 2:325-370

Cameron JW, Soost RK (1969) Characters of new populations of Citrus polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny. In: Proceedings of the First international Citrus symposium, University of California, riverside, California, pp 199-205

Cameron JW, Soost RK (1979) Sexual and nucellar embryony in F1 hybrids and advanced crosses of Citrus with Poncirus. Journal of the American Society for Horticultural Science 104:408-410

Cao D, Craig BA, Doerge RW (2005) A Model Selection-Based Interval-Mapping Method for Autopolyploids. Genetics 169:2371-2382

Cavalcante HC, Schiffino-Wittmann MT, Dornelles ALC (2000) Meiotic behaviour and pollen fertility in an open-pollinated population of 'Lee' mandarin (Citrus clementina * (C. paradisi * C. tangerina)). Scientia Horticulturae 86:103-114

Cavalier-Smith T (1978) Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. Journal of Cell Science 34:247-278

Chaudhury AM, Koltunow A, Payne T, Luo M, Tucker MR, Dennis ES, Peacock WJ (2001) Control of early seed development. Annu Rev Cell Dev Biol 17:677-699

Chen CL, Guo WW, Yi HL, Deng XX (2004) Cytogenetic analysis of two interspecific Citrus allotetraploid somatic hybrids and their diploid fusion parents. Plant Breeding 123:332-337

Chen CX, Lyon MT, O'Malley D, Federici CT, Gmitter J, Grosser JW, Chaparro JX, Roose ML, Gmitter FG, Jr. (2008) Origin and frequency of 2n gametes in Citrus sinensis * Poncirus trifoliata and their reciprocal crosses. Plant Science 174:1-8

Chen LG, Lou Q, Zhuang Y, Chen J, Zhang X, Wolukau J (2007) Cytological diploidization and rapid genome changes of the newly synthesized allotetraploids <i>Cucumis × hytivus</i>. Planta 225:603-614

Chen ZJ (2007) Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. Annual Review of Plant Biology 58:377-406

- Chen ZJ, Zhongfu N** (2006) Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *BioEssays* 28:240-252
- Chenuil A, Galtier N, Berrebi P** (1999) A test of the hypothesis of an autopolyploid vs. allopolyploid origin for a tetraploid lineage: application to the genus *Barbus* (Cyprinidae). *Heredity* 82:373-380
- Chopra VL, Kirti PB, Prakash S** (1996) Accessing and exploiting genes of breeding value of distant relatives of crop Brassicas. *Genetica* 97:305-312
- Clausen J, Keck D, Hiesey W** (1945) Experimental studies on the nature of species II. Plant evolution through amphiploidy and autopolyploidy, with examples from the Madiinae. . Publication 564 Washington, DC, USA: Carnegie Institute Washington
- Comai L** (2000) Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Molecular Biology* 43:387-399
- Comai L** (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6:836-846
- Conicella C, Genuardo G, Lucia R, Ramulu KS, Cardi T** (1997) Early tapetal degeneration and meiotic defects are involved in the male sterility of *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrids. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 95:609-617
- Consiglio F, Carputo D, Monti L, Conicella C** (2004) Exploitation of genes affecting meiotic non-reduction and nuclear restitution: Arabidopsis as a model? *Sexual Plant Reproduction* 17:97-105
- Contreras RN, Ranney TG, Tallury SP** (2007) Reproductive Behavior of Diploid and Allotetraploid Rhododendron L. "Fragrant Affinity". *HortScience* 42:31-34
- Corazza-Nunes MJ, Machado MA, Nunes WMC, Cristofani M, Targon M** (2002) Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica* 126:169-176
- Cuenca J, Froelicher Y, Aleza P, Juarez J, Navarro L, Ollitrault P** (soumis) Multilocus half-tetrad analysis and centromere mapping in Citrus: Evidences of SDR mechanism for 2n megagametophyte production and partial chromosome interference in mandarin cv 'Fortune'. *Heredity*
- D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, Rao S, Berding N, Glaszmann JC** (1996) Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics* 250:405-413

- Danzmann RG, Bogart JP** (1982) Evidence for a polymorphism in gametic segregation using a malate dehydrogenase locus in tetraploid treefrog *hyla versicolor*. *Genetics* 100:287-306
- Danzmann RG, Bogart JP** (1983) Further evidence for a polymorphism in gametic segregation in the tetraploid treefrog *hyla versicolor* using a glutamate oxaloacetic transaminase locus. *Genetics* 103:753-769
- Daunay MC, Chaput MH, Sihachakr D, Allot M, Vedel F, Ducreux G** (1993) Production and characterization of fertile somatic hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 85:841-850
- Del Bosco SF, Palazzolo E, Scarano MT, Germanà MA, Tusa N** (1998) Comparison between essential oil yield and constituents of an allotetraploid somatic hybrid of *Citrus* and its parents. *Advances in Horticultural Science* 12:72-77
- Del Bosco SF, Tusa N, Conicella C** (1999) Microsporogenesis in a *Citrus* interspecific tetraploid somatic hybrid and its fusion parents. *Heredity* 83:373-377
- Deng X, Gmitter FG, Jr., Grosser JW** (1995) Pollen fertility of auto- and allo-tetraploids of citrus. *Acta Agriculturae Sinica* 138-143
- Dujardin M, Hanna WW** (1990) Haploid Pearl Millet Pollen from Near-Tetraploid Interspecific Pennisetum Hybrids. *Crop Science* 30:393-396
- Durham RE, Liou PC, Gmitter FG, Jr., Moore GA** (1992) Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in Citrus. *Theoretical and Applied Genetics* 84:39-48
- Esen A, Soost RK** (1971) Unexpected triploids in Citrus: their origin, identification and possible use. *J Hered* 62:329-333
- Esen A, Soost RK** (1972) Tetraploid progenies from 2x X 4x crosses of Citrus and their origin. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 97:410-414
- Esen A, Soost RK** (1977) Adventive embryogenesis in Citrus and its relation to pollination and fertilization. *American Journal of Botany* 64:607-614
- Esen A, Soost RK** (1977) Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo: endosperm ploidy ratio in *Citrus*. *Proceedings of the Congresso Mundial de Citricultura 1973 International Society Of Citriculture* 2:53-63
- Esen A, Soost RK, Geraci G** (1978) Seed set, size, and development after 4x X 2x and 4x X 4x crosses in Citrus. *Euphytica* 27:283-294
- Esen A, Soost RK, Geraci G** (1979) Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in Citrus. *Journal of Heredity* 70:5

- Fang D, Krueger RR, Roose ML** (1998) Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123:612-617
- FAOSTAT** (2010) Food and Agriculture Organization of the United Nations. In: <http://faostat.fao.org/> (ed). <http://faostat.fao.org/>
- Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML** (1998) Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 96:812-822
- Feldman M, Liu B, Segal G, Abbo S, Levy AA, Vega JM** (1997) Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics* 147:1381-1387
- Ferrante S, Lucretti S, Reale S, De Patrizio A, Abbate L, Tusa N, Scarano MT** (2009) Assessment of the origin of new citrus tetraploid hybrids ($2n = 4x$) by means of SSR markers and PCR based dosage effects. *Euphytica* 173:223-233
- Fjellstrom RG, Beuselinck PR, Steiner JJ** (2001) RFLP marker analysis supports tetrasomic inheritance in *Lotus corniculatus* L. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 102:718-725
- Froelicher Y, Bouffin J, Dambier D, Bassene JB, Vanh Tran H, Ollitrault P** (2005) The triploid breeding program at CIRAD. Book of abstracts of the Seventh International Congress of Citrus Nurserymen ISCN, Cairo, Egypt 65-66
- Froelicher Y, Luro F, Ollitrault P** (2000) Analysis of meiotic behavior of the tetraploid *Clausena excavata* species by molecular marker segregation studies. *International Society of Citrus Congress* 140
- Froelicher Y, Mouhaya W, Bassene JB, Costantino G, Kamiri M, Luro F, Morillon R, Ollitrault P** (2010) New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genetics & Genomes* DOI 10.1007/s11295-11010-10314-x
- Froelicher Y, Mouhaya W, Bassene JB, Costantino G, Kamiri M, Luro F, Morillon R, Ollitrault P** (2010) New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal *citrus* phylogeny. *Tree Genetics & Genomes* DOI: 10.1007/s11295-11010-10314-x
- Froneman IJ, Breedts HJ, Koekemoer PJJ** (1996) Promising seedless citrus selections from the ITSC mutation breeding programme. *Inligtingsbulletin - Instituut vir Tropiese en Subtropiese Gewasse* 12-16

- Gaeta RT, Pires JC, Iniguez-Luy F, Leon EJ, Osborn TC** (2007) Genomic Changes in Resynthesized *Brassica napus* and Their Effect on Gene Expression and Phenotype. *Plant Cell* 19:3403-3417
- Gaikwad K, Kirti PB, Sharma A, Prakash S, Chopra VL** (1996) Cytogenetical and molecular investigations on somatic hybrids of *Sinapis alba* and *Brassica juncea* and their backcross progeny. *Plant Breeding* 115:480-483
- Gancel AL** (2004) Etude de l'hérédité des composés d'arôme chez les hybrides somatiques d'agrumes. In. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse Pascal Paoli, Corté, p 408
- Gancel AL, Grimplet J, Sauvage FX, Ollitrault P, Brillouet JM** (2006) Predominant expression of diploid mandarin leaf proteome in two citrus mandarin-derived somatic allotetraploid hybrids. *J Agric Food Chem* 54:6212-6218
- Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM** (2003) Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. *J Agric Food Chem* 51:6006-6013
- Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM** (2003) Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:6006-6013
- Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM** (2005a) Leaf volatile compounds of six *citrus* somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange, and grapefruit. *J Agric Food Chem* 53:2224-2230
- Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM** (2005b) Citrus somatic allotetraploid hybrids exhibit a differential reduction of leaf sesquiterpenoid biosynthesis compared with their parents. *Flavour and Fragrance Journal* 20:626-632
- García MR, Asins MJ, Carbonell EA** (2000) QTL analysis of yield and seed number in Citrus. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 101:487-493
- García R, Asíns MJ, Forner J, Carbonell EA** (1999) Genetic analysis of apomixis in Citrus and Poncirus by molecular markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 99:511-518
- Gavrilenko T, Thieme R, Rokka VM** (2001) Cytogenetic analysis of *Lycopersicon esculentum* (+) *Solanum tuberosum* somatic hybrids and their androgenetic regenerants. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 103:231-239

- Gawel NJ, Jarret RL** (1991) A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Mol Biol* 9:374-380
- Gmitter F, Hu X** (1990) The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary Citrus species (Rutaceae). *Economic Botany* 44:267-277
- Gmitter FG, Jr., Ling XB, Cai CY, Grosser JW** (1991) Colchicine-induced polyploidy in Citrus embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. *Plant Science (Limerick)* 74:135-141
- Gmitter FG, Ling XB, Deng XX** (1990) Induction of triploid Citrus plants from endosperm calli in vitro. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 80:785-790
- Grant VP** (1981) Polyploidy. Columbia University Press, New York 283 - 352:
- Grosser J, Gmitter F** (2010) Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1-15
- Grosser JW, Chandler JL** (2000) Somatic hybridization of high yield, cold-hardy and disease resistant parents for *citrus* rootstock improvement. *J Hort Sci Biotechnol* 75:641 - 644
- Grosser JW, Chandler JL** (2004) Production of twelve new allotetraploid somatic hybrid citrus breeding parents with emphasis on late maturity and cold-hardiness. *Journal of American Pomological Society* 58:21-28
- Grosser JW, Chandler JL, Duncan LW** (2007) Production of mandarin + pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. *Scientia Horticulturae* 113:33-36
- Grosser JW, Chandler JL, Duncan LW** (2007) Production of mandarin+pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. *Scientia Horticulturae* 113:33-36
- Grosser JW, Gmitter FG** (1990a) Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Reviews* 8:339-374
- Grosser JW, Gmitter FG** (1990b) Somatic hybridization of Citrus with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. *HortScience* 25:147-151
- Grosser JW, Medina-Urrutia V, Ananthakrishnan G, Serrano P** (2004) Building a replacement sour orange rootstock: somatic hybridization of selected mandarin + pummelo combinations. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129:530-534
- Grosser JW, Ollitrault P, Olivares-Fuster O** (2000) Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36:434-439

- Grover CE, Kim H, Wing RA, Paterson AH, Wendel JF** (2007) Microcolinearity and genome evolution in the AdhA region of diploid and polyploid cotton (*Gossypium*). *The Plant Journal* 50:995-1006
- Gulsen O, Roose ML** (2001) Lemons: diversity and relationships with selected Citrus genotypes as measured with nuclear genome markers. *American society of horticultural sciences* 126:309-317
- Guo WW, Prasad D, Cheng YJ, Serrano P, Deng XX, Grosser JW** (2004) Targeted cybridization in citrus: transfer of Satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness. *Plant Cell Reports* 22:752-758
- Hanneman RE, Peloquin SJ** (1968) Ploidy levels of progeny from diploid-tetraploid crosses in the potato *American Journal of Potato Research* 45:255-261
- Hardy OJ, Vekemans X** (2001) Patterns of allozyme variation in diploid and tetraploid *Centaurea jacea* at different spatial scales. *Evolution* 55:943-954
- Hartung JS, Daniel JF, Pruvost OP** (1993) Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Applied and environmental microbiology* 59:1143
- Hearn CJ** (1969) Self incompatibility and the effects of different pollen sources upon fruit characteristics of four Citrus hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 87:183-187
- Hegarty MJ, Hiscock SJ** (2008) Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Current Biology* 18:435-444
- Herrero R, Asins MJ, Pina JA, Carbonell EA, Navarro L** (1996) Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 93:1327-1334
- Hickok LG** (1978a) Homoeologous chromosome pairing and restricted segregation in the fern *Ceratopteris*. *American Journal of Botany* 65:516-521
- Hickok LG** (1978b) Homoeologous chromosome pairing: frequency differences in inbred and intraspecific hybrid polyploid ferns. *Science* 202:982-984
- Hieter P, Griffiths T** (1999) GENETICS:Polyploidy--More Is More or Less. *Science* 285:210-211
- Hodgson R** (1967) Horticultural varieties of citrus. *The citrus industry* 1:431-591
- Hodgson RW** (1967) Horticultural varieties of Citrus. In: Reuther W, Webber HJ, D. BL (eds) *The Citrus Industry*. University of California, Riverside, pp 431-589

- Hong QB, Xiang SQ, Chen KL, Chen LG** (2001) Two complementary dominant genes controlling apomixis in genus *Citrus* and *poncirus*. *Yi chuan xue bao*= *Acta genetica Sinica* 28:1062-1067
- Ikeda F** (1981) Repression of Polyembryony by gamma rays in polyembryonnic *Citrus*. *Proceeding of International Society of Citriculture* 1:14-39
- Imbert E** (2005) Les agrumes de méditerranée. Un sur deux! *Fruitrop* 122:4-6
- Imbert E** (2007) Panorama statistique petits agrumes. *Fruitrop* 150:28-29
- Imbert E** (2008) Agrumes. *Fruitrop* 161:5-36
- Isshiki S, Taura T** (2003) Fertility restoration of hybrids between *Solanum melongena* L. and *S. aethiopicum* L. Gilo Group by chromosome doubling and cytoplasmic effect on pollen fertility. *Euphytica* 134:195-201
- Iwamasa M** (1966) Studies on the sterility in genus *Citrus* with special reference to the sleeplessness. *Bulletin of the Horticulture Research Station* B6:1-81
- Iwamasa M** (1966) Studies on the sterility in the genus *Citrus* with special reference to the seedlessness. *Bul Hort Res Sta Japan* 6:1-77
- Iwamasa M, Ueno I, Nishiura M** (1967) Inheritance of nucellar embryony in *Citrus*. *Bull Hortic Sta Jpn Ser B* No 7
- Jackson RC, Jackson JW** (1996) Gene segregation in autotetraploids: prediction from meiotic configurations. *American Journal of Botany* 83:673-678
- Jannoo N, Grivet L, David J, D'Hont A, Glaszmann JC** (2004) Differential chromosome pairing affinities at meiosis in polyploid sugarcane revealed by molecular markers. *Heredity* 93:460-467
- Jarrell DC, Roose ML, Traugh SN, Kupper RS** (1992) A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. *Theoretical and Applied Genetics* 84:49-56
- Jenczewski E, Eber F, Manzanares-Dauleux MJ, Chevre AM** (2002) A strict diploid-like pairing regime is associated with tetrasomic segregation in induced autotetraploids of kale. *Plant Breeding* 121:177-179
- Ji Y, Pertuzé R, Chetelat R** (2004) Genome differentiation by GISH in interspecific and intergeneric hybrids of tomato and related nightshades. *Chromosome Research* 12:107-116
- Jong JHd, Wolters AMA, Kok JM, Verhaar H, Eden Jv** (1993) Chromosome pairing and potential for intergeneric recombination in some hypotetraploid somatic hybrids of *Lycopersicon esculentum* (+) *Solanum tuberosum*. *Genome* 36:

- Juarez J, Aleza P, Olivares-Fuster O, Navarro L** (2004) Recovery of tetraploid clementine plants (*Citrus clementina* Hort.Ex Tan) by in vitro colchicines treatment of shoot tips. Mohamed E eds Program and Abstract, 10th Inter Soc Citriculture, Agadir, Morocco 80:
- Juarez J, Navarro L, Guardiola JL** (1976) Obtention de plantes de divers cultivars de clementiniers au moyen de la culture nucelle in vitro. *Fruits* 31:751-762
- Kaul MLH, Murthy TKG** (1985) Mutant genes affecting higher plant meiosis. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 70:449-466
- Kepiro J, Roose M** (2009) AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata*. *Tree Genetics & Genomes* 6:1-11
- Kepiro JL, Roose ML** (2007) Nucellar Embryony. In *Citrus Breeding: introduction and objectives Citrus genetics, breeding and biotechnology* 141-149
- Khan IA, Kender WJ** (2007) Citrus Breeding: introduction and objectives. *Citrus genetics, breeding and biotechnology* 1-8
- Khan IA, Roose ML** (1988) Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliolate orange. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 113:105-110
- Kobayashi S, Ohgawara T, Saito W, Nakamura Y, Shimizu J** (1995) Fruit Characteristics and Pollen Fertility of Citrus Somatic Hybrids. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 64:283-289
- Koltunow AM, Bicknell RA, Chaudhury AM** (1995a) Apomixis: Molecular Strategies for the Generation of Genetically Identical Seeds without Fertilization. *Plant Physiology* 108:1345-1352
- Koltunow AM, Brennan P, Bond JE, Barker SJ** (1998) Evaluation of genes to reduce seed size in shape Arabidopsis and tobacco and their application to shape Citrus. *Molecular Breeding* 4:235-235
- Koltunow AM, Soltys K, Nito N, McClure S** (1995b) Anther, ovule, seed, and nucellar embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Canadian Journal of Botany* 73:1567-1582
- Krug C** (1943) Chromosome numbers in the subfamily Aurantioideae with special reference to the genus Citrus. *Botanical Gazette* 104:602-611
- Lapin WK** (1937) Investigations on polyploidy in Citrus work. All-Union Scientific Research Institute Humid Subtropics 1:1-68

- Le Comber SC, Ainouche ML, Kovarik A, Leitch AR** (2010) Making a functional diploid: from polysomic to disomic inheritance. *New Phytologist* 186:113-122
- Leino M, Teixeira R, Landgren M, Glimelius K** (2003) Brassica napus lines with rearranged Arabidopsis mitochondria display CMS and a range of developmental aberrations. *Theoretical and Applied Genetics* 106:1156-1163
- Leitch AR, Leitch IJ** (2008) Genomic Plasticity and the Diversity of Polyploid Plants. *Science* 320:481-483
- Leitch IJ, Bennett MD** (1997) Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science* 2:470-476
- Levy AA, Feldman M** (2004) Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. *Biological Journal of the Linnean Society* 82:607-613
- Lewis WH** (1980 a) Polyploidy: biological relevance. Plenum Press, New York
- Li J, Harper LC, Golubovskaya I, Wang CR, Weber D, Meeley RB, McElver J, Bowen B, Cande WZ, Schnable PS** (2007) Functional Analysis of Maize RAD51 in Meiosis and Double-Strand Break Repair. *Genetics* 176:1469-1482
- Linke B, Nothnagel T, Ouml, rner T** (2003) Flower development in carrot CMS plants: mitochondria affect the expression of MADS box genes homologous to GLOBOSA and DEFICIENS. *The Plant Journal* 34:27-37
- Liu B, Brubaker CL, Mergeai G, Cronn RC, Wendel JF** (2001) Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome* 44:321-330
- Liu B, Vega JM, Feldman M** (1998) Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of Triticum and Aegilops. II. Changes in low-copy coding DNA sequences. *Genome* 41:535-542
- Liu J, Deng X** (2002) Regeneration and analysis of citrus interspecific mixoploid hybrid plants from asymmetric somatic hybridization. *Euphytica* 125:13-20
- Lukens LN, Pires JC, Leon EJ, Vogelzang R, Oslach L, Osborn TC** (2006) Patterns of Sequence Loss and Cytosine Methylation within a Population of Newly Resynthesized Brassica napus Allopolyploids. *Plant Physiol* 140:336-348
- Luo ZW, Zhang Z, Leach L, Zhang RM, Bradshaw JE, Kearsey MJ** (2006) Constructing genetic linkage maps under a tetrasomic model. *Genetics* 172:2635
- Luro F** (1993) Utilisation des marqueurs moléculaires pour la cartographie du génome et les études génétiques chez les agrumes. Thèse de Docteur es Sciences, Université de Bordeaux II

- Luro F, Maddi F, Ollitrault P, Rist D** (2000) Identification of 2n gametes parental origin and mode of nuclear restitution of spontaneous triploid citrus hybrids. In : International Society of Citriculture 9th ISC Congress, 3-7 December 2000, Orlando (Etats-Unis)
- Luro F, Maddy F, Jacquemond C, Froelicher Y, Morillon R, Rist D, Ollitrault P** (2004) Identification and evaluation of diplogyny in clementine (*Citrus clementina*) for use in breeding. *Acta Horticulturae* 841-847
- Luro F, Maddy F, Jacquemond C, Froelicher Y, Morillon R, Rist D, Ollitrault P** (2004) Identification and evaluation of diplogyny in clementine (*Citrus clementina*) for use in breeding. In: Proceedings of the Eleventh Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, Angers, France, 1-5 September 2003, pp 841-847
- Lyttle TW** (1991) Segregation Distorters. *Annu Rev Genet* 25:511-557
- Madlung A, Masuelli RW, Watson B, Reynolds SH, Davison J, Comai L** (2002) Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Physiology* 129:733
- Marocain. Mdla** (2009) "Plan Maroc Vert". In: Région de Souss-Massa D (ed), pp 1-60
- Marsden JE, Schwager SJ, May B** (1987) Single-Locus Inheritance in the Tetraploid Treefrog *Hyla versicolor* With an Analysis of Expected Progeny Ratios in Tetraploid Organisms. *Genetics* 116:299-311
- Mouhaya W, Allario T, Brumos J, Andres F, Froelicher Y, Luro F, Talon M, Ollitrault P, Morillon R** (2010) Sensitivity to high salinity in tetraploid citrus seedlings increases with water availability and correlates with expression of candidate genes. *Functional Plant Biology* 37:674-685
- Murashige T, Tucker DPH** (1969) Growth factor requirements of tissue culture. *Proc First Intl Citrus Symp* 3:1155-1161
- Mustard JM, Lynch SJ, Nelson RO** (1956) Pollination and floral studies of the Minneola tangelo
Proceedings of the Florida State Horticultural Society 69:277-281
- Navarro L, Juarez J, Aleza P, Pina JA** (2003) Recovery of triploid seedless mandarin hybrids from 2N x 2N and 2N x 4N crosses by embryo rescue and flow cytometry. In: Plant biotechnology 2002 and beyond Proceedings of the 10th IAPTC&B Congress, Orlando, Florida, USA, 23-28 June, 2002
- Navarro L, Olivares-Fuster O, Juarez J, Aleza P, Pina JA, Ballester-Olmos JF, Cervera M, Fagoaga C, Duran-Vila N, Pena L** (2004) Applications of biotechnology to citrus improvement in Spain. In: Citrus and other subtropical and tropical fruit crops: issues,

advances and opportunities, a proceedings of the XXVI International Congress, Toronto, Canada, 11-17 August, 2002, pp 221-234

Nesumi H, Nakano M, Yoshida T (2001) mode of inheritance of the abnormal development of impregnated ovules derived from Makaku-kishu. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 70:403

Nicolosi E (2007) Origin and taxonomy. In: Citrus genetics, breeding and biotechnology, pp 19-43

Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. Theor Appl Genet 100:1155 - 1166

Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, Malfa SI, Continella G, Tribulato E (2000) *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. TAG Theoretical and Applied Genetics 100:1155-1166

Nogler JA (1984) Gametophytic apomixis. In: Jhri BM (ed) Embryology of angiosperms Springer, Berlin Heidelberg New York 475-518

Oddou-Muratorio S, Vendramin G, Buiteveld J, Fady B (2009) Population estimators or progeny tests: what is the best method to assess null allele frequencies at SSR loci? Conservation Genetics 10:1343-1347

Ohgawara T, Kobayashi S, Ishii S, Yoshinaga K, Oiyama I (1991) Fertile fruit trees obtained by somatic hybridization: navel orange (*Citrus sinensis*) and Troyer citrange (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*). Theoretical and Applied Genetics 81:141-143

Oiyama I, Kobayashi S, Yoshinaga K, Ohgawara T, Ishii S (1991) Use of pollen from a somatic hybrid between Citrus and Poncirus in the production of triploids. HortScience 26:1082

Oiyama I, Okudai N, Takahara T (1982) Ploidy levels of seedlings obtained from 2x X 4x crosses in citrus. In: Proceedings of the International Society of Citriculture, 1981 Volume I, pp 32-34

Ollitrault P (1990b) Somatic embryo grafting : a promissing technique for citrus breeding and propagation. Proceeding of International Society of Citriculture 3rd Congress Australie 10pp:

Ollitrault P, Dambier D, Allent V, Luro F, Jacquemond C (1996) *In vitro* rescue and selection of spontaneous triploids by flow cytometry for easy peeler *Citrus* breeding. Proceedings of the Eighth International Citrus congress International Society of Citriculture, Sun City, South Africa 2:913-917

- Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Carreel F, d'Hont A, Luro F, Bruyere S, Cabasson C, Lotfy S, Joumaa A, Vanel F, Maddi F, Treanton K, Grisoni M (2000)** Somatic hybridisation potential for Citrus germplasm utilization. *Cahiers Agricultures* 9:223-236
- Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Carreel F, D'Hont A, Luro F, Bruyere S, Cabasson C, Lotfy S, Joumaa A, Vanel F, Maddi F, Treanton K, Grisoni M (2000b)** Somatic hybridisation potential for *Citrus* germplasm utilization. *Cahiers Agricultures* 9:223-236
- Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Froelicher Y (2008)** Ploidy manipulation for breeding seedless triploid *citrus*. *Plant Breeding Reviews* 30:323-352
- Ollitrault P, Dambier D, Sudahono, Mademba-Sy F, Vanel F, Luro F, Aubert B (1998)** Biotechnology for triploid mandarin breeding. *Fruits (Paris)* 53:307-317
- Ollitrault P, De Rocca Serra D (1992)** L'amélioration des agrumes. I: Les ressources génétiques. II: Créations variétales et biotechnologies= Citrus breeding. I: Management of genetic resources. II: Genetic improvement and biotechnology. *Fruits* 47:115-134
- Ollitrault P, Froelicher Y, Dambier D, Seker M (2000c)** Rootstock breeding by somatic hybridisation for the Mediterranean citrus industry. In: *Proceedings of the First International Symposium on Citrus Biotechnology*, Eilat, Israel, 29 November to 3 December, 1998, pp 157-162
- Ollitrault P, Guo WW, Grosser JW (2007)** Somatic hybridization. In: *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CAB International, Wallingford UK, pp 235-260
- Ollitrault P, Jacquemond C (1994)** Facultative apomixis, spontaneous polyploidization and inbreeding in *Citrus volkameriana* seedlings. In: *Symposium on tropical orchards*, Montpellier, France, 30 Aug-5 Sep, 1993, pp 398-400, 479-480
- Ollitrault P, Luro F (1997)** Les agrumes. In: *L'amélioration des plantes tropicales* A. charrier et al., eds., Montpellier, France, CIRAD-Orstom:13-36
- Ollitrault P, Terol J, Chen C, Federici CT, Lotfy S, Hippolyte I, Ollitrault F, Bérard A, Chauveau A, Costantino G, Kacar Y, Mu L, Cuenca J, Garcia A, Froelicher Y, Aleza P, Boland A, Billot C, Navarro L, Luro F, Roose M, Gmitter FG, Talon M, Brunel D (2011)** A reference linkage map of *C. clementina* based on SNPs, SSRs and InDels
In: *Plant and Animal Genome XIX Conference*, San Diego, California, USA
- Olson MS (1997)** Bayesian Procedures for Discriminating Among Hypotheses With Discrete Distributions: Inheritance in the Tetraploid *Astilbe biternata*. *Genetics* 147:1933-1942

- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Martienssen RA** (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* 19:141-147
- Otto SP, Whitton J** (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu Rev Genet* 34:401-437
- Ozkan H, Levy AA, Feldman M** (2001) Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *The Plant Cell Online* 13:1735-1747
- Ozkan H, Levy AA, Feldman M** (2002) Rapid differentiation of homeologous chromosomes in newly-formed allopolyploid wheat. *Israel Journal of Plant Sciences* 50:65-76
- Pairon MC, Jacquemart AL** (2005) Disomic segregation of microsatellites in the tetraploid *Prunus serotina* Ehrh. (*Rosaceae*). *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130:729-734
- Pan G, Zhou Y, Fowke LC, Wang H** (2004) An efficient method for flow cytometric analysis of pollen and detection of 2 n nuclei in *Brassica napus* pollen *Plant Cell Reports* 23:196-202
- Parlevliet JE, Cameron JW** (1959) Evidence on the inheritance of nucellar embryony in Citrus. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 74:252-260
- Parlevliet JE, Cameron JW** (1959) Evidence on the inheritance of nucellar embryony in citrus. In, pp 252-260
- Paterson A** (2005) Polyploidy, evolutionary opportunity, and crop adaptation. *Genetica* 123:191-196
- Pelletier G, Budar F** (2007) The molecular biology of cytoplasmically inherited male sterility and prospects for its engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 18:121-125
- Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrit P, Remy R, Rousselle, Renard M** (1982) Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Molecular & General Genetics* 191:244-250
- Pijnacker LP, Ferwerda MA, Mattheij WM** (1992) Microsporogenesis in three tetraploid somatic hybrids of potato and their di(ha)ploid fusion partners. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 85:269-273
- Pires JC, Zhao J, Schranz ME, Leon EJ, Quijada PA, Lukens LN, Osborn TC** (2004) Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassica* polyploids (*Brassicaceae*). *Biological Journal of the Linnean Society* 82:675-688
- Praloran J** (1971) *Les Agrumes*, par un groupe de spécialistes animé. G.-P. Maisonneuve & Larose

- Qu L, Hancock JF, Whallon JH** (1998) Evolution in an autopolyploid group displaying predominantly bivalent pairing at meiosis: genomic similarity of diploid *Vaccinium darrowi* and autotetraploid *V. corymbosum* (Ericaceae). *American Journal of Botany* 85:698-
- Raghuvanshi SS** (1962) Cytogenetical studies in genus *Citrus* IV. Evolution in genus *Citrus*. *Cytologia* 27:172-188
- Rahman MM, Nito N** (1994) Phylogenetic relationships in the kumquat (*Fortunella*) as revealed by isozyme analysis. *Scientia Horticulturae* 57:17-28
- Ramsey J, Schemske D** (2002) Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:589-639
- Ramsey J, Schemske DW** (2002) Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:589-639
- Rao MN, Soneji JR, Chen CX, Huang S, Gmitter FG, Jr.** (2008) Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. *Tree Genetics and Genomes* 4:113-124
- Richards AJ** (1986) *Plant breedings systems*. London: Allen & Unwin
- Riddle C, Birchler A** (2003) Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. *Trends in Genetics* 19:597-600
- Rieseberg LH** (2001) Polyploid evolution: Keeping the peace at genomic reunions. *Current Biology* 11:925-928
- Rieseberg LH, Willis JH** (2007) Plant Speciation. *Science* 317:910-914
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, do Valle CB** (2005) Multiple spindles and cellularization during microsporogenesis in an artificially induced tetraploid accession of *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). *Plant cell reports* 23:522-527
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, do Valle CB, Jank L** (2004) Asynchronous meiosis in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha*. *Plant cell reports* 23:304-310
- Ronfort J, Jenczewski E, Bataillon T, Rousset F** (1998) Analysis of population structure in autotetraploid species. *Genetics* 150:
- Roose ML, Kupper RS** (1992) Causes and Consequences of variability in rootstocks. *Proceedings of the first international seminar on citriculture in Pakistan* 122-130
- Roose ML, Williams TE** (2005) Mandarin variety named 'Tango'. In: <http://www.freepatentsonline.com/PP17863pdf>. Google Patents
- Ruiz C, Asins M** (2003) Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 106:826-836

- Saleh B, Allario T, Dambier D, Ollitrault P, Morillon R** (2008) Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *Comptes Rendus Biologies* 331:703-710
- Salmon A, Ainouche ML, Wendel JF** (2005) Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). In. Blackwell Science Ltd, pp 1163-1175
- Salmon A, Ainouche ML, Wendel JF** (2005) Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology* 14:1163-1175
- Santos JL, Alfaro D, Sanchez-Moran E, Armstrong SJ, Franklin FCH, Jones GH** (2003) Partial diploidization of meiosis in autotetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 165:1533-1540
- Schultz RJ** (1980) Role of polyploidy in the evolution of fishes. See Ref 13
- Scora R** (1975) On the history and origin of citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 102:369-375
- Self SG, Liang KY** (1987) Asymptotic properties of maximum likelihood estimators and likelihood ratio tests under nonstandard conditions. *Journal of the American Statistical Association* 82:605-610
- Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, Feldman M, Levy AA** (2001) Sequence Elimination and Cytosine Methylation Are Rapid and Reproducible Responses of the Genome to Wide Hybridization and Allopolyploidy in Wheat. *Plant Cell* 13:1749-1759
- Singh RJ** (2003) *Plant cytogenetics*. CRC
- Sokal RR, Rohlf FJ** (1995) *Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research* Ed 3 W H Freeman, New York
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, dePamphilis CW, Wall PK, Soltis PS** (2009) Polyploidy and angiosperm diversification. *Journal of Botany* 96:336-348
- Soltis DE, Riesberg LH** (1986) Autopolyploidy in *Tolmiea mziesii* (Saxifragaceae): genetic insights from enzyme electrophoresis. *American Journal of Botany* 73:310–318
- Soltis DE, Soltis PS** (1988) Electrophoretic evidence for tetrasomic segregation in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae). *Heredity* 60:375-382
- Soltis DE, Soltis PS** (1993) Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences* 12:243-273
- Soltis DE, Soltis PS** (1995) The dynamic nature of polyploid genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:8089-8091

- Soltis DE, Soltis PS** (1999) Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 14:348-352
- Soltis DE, Soltis PS, Tate JA** (2004) Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist* 161:173-191
- Soltis PS, Soltis DE** (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:7051-7057
- Song K, Lu P, Tang K, Osborn TC** (1995) Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *PNAS* 92:7719-7723
- Song K, Lu P, Tang K, Osborn TC** (1995) Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:7719-7723
- Soost RK** (1965) Incompatibility alleles in the genus Citrus. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 87:176-180
- Soost RK** (1969) The incompatibility gene system in Citrus. *Proc Ist Int Citrus Symposium*, H Chapman, ed 1:189-190
- Soost RK** (1987) Breeding Citrus - Genetics and Nucellar Embryony. In AAbbott é R Atkin : *Improving Vegetatively Propagated crops*, Academic Press, London 83-110
- Soost RK, Cameron JW** (1982) 'Oroblanco', a triploid pummelo-grapefruit hybrid. In: *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1981 Volume I, pp 59-60
- Spielman M, Vinkenoog R, Scott RJ** (2003) Genetic mechanisms of apomixis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 358:1095-1103
- Starrantino A, Recupero GR** (1981) Citrus hybrids obtained *in vitro* from 2x females X 4x males. *Proceedings of the Fourth International Citrus congress International Society of Citriculture*, Tokyo, Japan 1:31-32
- Stebbins GL, Jr** (1950) *Variation and Evolution in plants*. Columbia University Press, New York
- Stebbins GL, Jr** (1958) The inviability, sterility and weakness of inter-specific hybrids. *Adv Genet* 9:
- Stift M, Berenos C, Kuperus P, Van Tienderen P** (2008) Segregation Models for Disomic, Tetrasomic and Intermediate Inheritance in Tetraploids: A General Procedure Applied to *Rorippa* (Yellow Cress) Microsatellite Data. *Genetics* 179:2113-2123

- Stone BC** (1985) New and noteworthy paleotropical species of Rutaceae. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 137:213-228
- Swingle W** (1915) A new genus, *Fortunella*, comprising four species of kumquat oranges. *J Washington Academy of Sciences* 5:165–176
- Swingle WT, Reece PC** (1967) The botany of citrus and its wild relatives. The citrus industry, University of California ed Reuther W, Webber HJ & Bachelor LD: Riverside, California 1:190-430
- Sybenga J** (1996) Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids: do segmental allopolyploids exist? *Genome* 39:1176-1184
- Tachikawa T** (1971) Investigation in the breeding of citrus tree IV on the chromosome number in citrus. *Bul Shizuoka Pref Citrus Exp Sta* 9:11-25
- Tanaka T** (1961) *Citrologia: semi centennial commemoration papers on citrus studies*. . Citrologia supporting fondation Osaka Japan 114
- Tanaka T** (1977) Fundamental discussion of Citrus classification. *Stud Citrol* 14:1-6
- Tate JA, Ni Z, Scheen A-C, Koh J, Gilbert CA, Lefkowitz D, Chen ZJ, Soltis PS, Soltis DE** (2006) Evolution and Expression of Homeologous Loci in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae), a Recent and Reciprocally Formed Allopolyploid. *Genetics* 173:1599-1611
- Tatum JH, Berry RE, Hearn CJ** (1974) Characterization of Citrus cultivars and separation of nucellar and zygotic seedlings by thin layer chromatography. *Proc Fla State Hort Soc* 87:75-81
- Teixeira RT, Farbos I, Glimelius K** (2005) Expression levels of meristem identity and homeotic genes are modified by nuclear-mitochondrial interactions in alloplasmic male-sterile lines of *Brassica napus*. *Plant Journal* 42:731-742
- Thomzik JE, Hain R** (1988) Transfer and segregation of triazine tolerant chloroplasts in *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 76:165-171
- Tian Y, Ke S, Ke C** (1996) Polymerase chain reaction for detection and quantitation of *Liberobacter asiaticum*, the bacterium associated with huanglongbing (greening) of citrus in China. In, pp 252-257
- Tisserat B, Murashige T** (1977) Repression of asexual embryogenesis in vitro by some plant growth regulators
In vitro 13:799-805
- Ton LD, Krezdorn AH** (1967) Growth of pollen tubes in three incompatible varieties of Citrus. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 89:211-215

- Toppino L, Mennella G, Rizza F, D'Alessandro A, Sihachakr D, Rotino GL** (2008) ISSR and Isozyme Characterization of Androgenetic Dihaploids Reveals Tetrasomic Inheritance in Tetraploid Somatic Hybrids between *Solanum melongena* and *Solanum aethiopicum* Group Gilo. In, p esm122
- Torres AM, Soost RK, Diedenhofen U** (1978) Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. *American Journal of Botany* 65:869-881
- Tu Y, Sun J, Liu Y, Ge X, Zhao Z, Yao X, Li Z** (2008) Production and characterization of intertribal somatic hybrids of *Raphanus sativus* and *Brassica rapa* with dye and medicinal plant *Isatis indigotica*. *Plant cell reports* 27:873-883
- Tusa N, Abbate L, Renda A, Ruberto G** (2007) Polyphenols distribution in juices from Citrus allotetraploid somatic hybrids and their sexual hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:9089-9094
- Udall JA, Quijada PA, Osborn TC** (2005) Detection of chromosomal rearrangements derived from homeologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. *Genetics* 169:967-979
- Udall JA, Wendel JF** (2006) Polyploidy and Crop Improvement. *Crop Science* 46:3-14
- Vamosi JC, Dickinson TA** (2006) Polyploidy and Diversification: A Phylogenetic Investigation in Rosaceae. *Journal of Plant Sciences* 167:349-358
- Vardi A, Spiegel-Roy P, Elchanati A** (1993) Mandarin tree names Mor. In: <http://www.freepatentsonlinecom/PP08378pdf>. Google Patents
- Varotto S, Nenz E, Lucchin M, Parrini P** (2001) Production of asymmetric somatic hybrid plants between *Cichorium intybus* L. and *Helianthus annuus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 102:950-956
- Wakana A, Hanada N, Park SM, Fukudome I, Kajiwara K** (2005) Production of tetraploid forms of acid Citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicine. *J Fac Agric Kyushu Univ* 50(1):93-102
- Wakana A, Ngo XB, Isshiki S** (1998) Self-incompatibility in Citrus: linkage between GOT isozyme loci and the incompatibility loci. In: Omura M, Hayashi T and Scott NS (eds) *Breeding and Biotechnology for Fruit Trees; Second Japan-Australia International Workshop* NIFTS/CSIRO 90-93
- Wang J, Tian L, Lee H-S, Wei NE, Jiang H, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Comai L, Chen ZJ** (2006) Genomewide Nonadditive Gene Regulation in Arabidopsis Allotetraploids. *Genetics* 172:507-517

- Wang J, Tian L, Madlung A, Lee H-S, Chen M, Lee JJ, Watson B, Kagochi T, Comai L, Chen ZJ** (2004) Stochastic and Epigenetic Changes of Gene Expression in Arabidopsis Polyploids. *Genetics* 167:1961-1973
- Watson LE, Elisens WJ, Estes JR** (1991) Electrophoretic and cytogenetic evidence for allopolyploid origin of *Manihottia mohrii* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 78:408–416
- Wenbaum S, Cohen E, Spiegel-Roy P** (1982) Rapid screening of Satsuma mandarin progeny to distinguish nucellar and zygotic seedlings
Hortscience 17:239-240
- Wendel JF** (2000) Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42:225-249
- Winters H** (1976) *Microcitrus papuana*, a new species from Papua New Guinea (Rutaceae). *Baileya* 20:19-24
- Wolfe KH** (2001) Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nat Rev Genet* 2:333-341
- Wu J, Ferguson AR, Mooney PA** (2005) Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid Citrus breeding. *Euphytica* 141:229-235
- Wu R, Gallo-Meagher M, Littell RC, Zeng ZB** (2001) A general polyploid model for analyzing gene segregation in outcrossing tetraploid species. *Genetics* 159:869-882
- Xu XY, Hu ZY, Li JF, Liu JH, Deng XX** (2007) Asymmetric somatic hybridization between UV-irradiated Citrus unshiu and C. sinensis: regeneration and characterization of hybrid shoots. *Plant cell reports* 26:1263-1273
- Yamamoto M, Matsumoto R, Okudai N, Yamada Y** (1997) Aborted anthers of Citrus result from gene-cytoplasmic male sterility. *Scientia Horticulturae* 70:9-14
- Yamamoto M, Matsumoto R, Yamada Y** (1995) Relationship between sterility and seedlessness in citrus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 64:23-29
- Yamamoto M, Okudai N, Matsumoto R** (1992) Segregation for aborted anthers in hybrid seedlings using Citrus nobilis * C. deliciosa cv. Encore as the seed parent. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 60:785-789
- Yemets AI, Kundel'chuk OP, Smertenko AP, Solodushko VG, Rudas VA, Gleba YY, Blume YB** (2000) Transfer of amiprothosmethyl resistance from a Nicotiana plumbaginifolia mutant by somatic hybridisation. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 100:847-857

Abstract

Citrus somatic hybridization via protoplast fusion has become an integral part of citrus variety improvement programs worldwide. Applications of somatic hybridization to citrus scion improvement include the production of quality tetraploid breeding parents that can be used in interploid crosses to generate seedless triploids. Applications of somatic hybridization to citrus rootstock improvement include the production of allotetraploid hybrids that combine complementary diploid rootstocks, and to combine citrus with sexually incompatible or difficult to hybridize genera that possess traits of interest for germplasm expansion.

The objective of this thesis is 1/ To determine the impact of somatic hybridization on the somatic hybrids phenotype especially on reproduction characteristics (Pollen fertility and Apomixis/polyembryony) 2/ To analyze the allelic inheritance in citrus intergeneric and interspecific somatic hybrids, and finally 3/ to establish the origin of ploidy variation in interploidal progenies involving citrus tetraploid somatic hybrids.

Analysis of reproduction characteristics in citrus somatic hybrids, generally, showed intermediate pollen characteristics to their fusion parents, while they showed an identical female fertility as one of their diploid parents. Concerning apomixis/polyembryony transmission, when compared to their diploid parents, all studied somatic hybrids were apomictic and polyembryonic. However, significative raise of zygotic rates in some were observed compared to their diploid parents. Moreover, embryony rates decreased significantly.

Cytogenetic analysis of citrus interspecific somatic hybrid meiosis displayed 11% of tetravalents and 76% of bivalents. Inheritance of the tetraploid hybrid was analyzed by genotyping the triploid progeny derived from a cross between a diploid pummelo and the tetraploid somatic hybrid. Markers segregation was largely compatible with tetrasomic and intermediate inheritance, with preferential pairing of homeologous chromosomes. However at the intergeneric level, obtained results support intermediate inheritance in a Citrus intergeneric somatic hybrid with occurrence of preferential pairing of homologous chromosomes.

Molecular analysis of interploidal crosses progeny implying citrus somatic hybrids revealed different ploidy levels and that tetraploids were issued from a diploid male and an unreduced female gamete. However, diploids were issued from a haploid female and a viable haploid male gamete coming from the tetraploid somatic hybrid.

Keywords: *Citrus*, polyploids, somatic hybridization, allelic inheritance, SSR, meiosis, apomixis

Résumé

Dans de nombreux bassins de production d'agrumes, la diversification des petits agrumes de type mandarinier sans pépins est au cœur des stratégies de segmentation du marché. Cette diversification variétale s'appuie largement sur la création d'hybrides triploïdes. En effet, grâce à la parthénocarpie des agrumes, la stérilité engendrée par la triploïdie n'affecte pas la fruidibondité et permet d'obtenir des fruits sans pépins.

Afin d'y parvenir, le CIRAD a mis en place un programme d'hybridation somatique permettant d'augmenter le nombre de parents tétraploïdes disponibles et ainsi contribuer à une meilleure définition des stratégies d'amélioration des agrumes triploïdes. Dans le but d'avoir une meilleure prévision du phénotype des hybrides polyploïdes en fonction de celui de leurs géniteurs, l'étude de la biologie de la reproduction de ces hybrides somatiques s'imposait.

Ce travail a pour objectif 1/ De comprendre la transmission du système de reproduction des hybrides somatiques d'agrumes en fonction de leurs parents diploïdes. 2/ De mieux prévoir la structure génétique des hybrides triploïdes lors des croisements $2x \times 4x$. 3/ De comprendre l'origine des variations de ploïdie observées dans les croisements entre diploïdes et tétraploïdes et d'évaluer la part de différents phénomènes tels que la gaméto-genèse et l'avortement précoce des embryons dans cette variabilité.

Ce travail représente la première étude sur la transmission du système de reproduction des hybrides somatiques. Les résultats obtenus montrent la conservation de certains caractères parentaux mais aussi de l'apparition de nouveaux phénotypes. L'ensemble des hybrides a montré une fertilité identique ou intermédiaire à celle du parent le moins fertile. Cependant, une diminution du degré de polyembryonie et une augmentation du pourcentage d'embryons d'origine zygotique ont été observées chez certains hybrides somatiques.

L'étude de la ségrégation allélique chez un hybride somatique interspécifique d'agrumes a été réalisée sur un hybride somatique inter spécifique tétraploïde d'agrumes entre la mandarine commune (*Citrus reticulata* Blanco) et le citron Eureka (*Citrus limon* (L.) Burm. F.). L'étude cytogénétique a révélé la formation d'une majorité de bivalents (76%) avec une présence de mono et tétravalents (respectivement 4% et 11%). L'étude moléculaire de la ségrégation par marqueurs de type SSR polymorphes ne présentant aucun allèle en commun entre les trois parents, a été réalisée à l'aide de dix sept marqueurs moléculaires. L'analyse statistique des résultats obtenus montre une ségrégation tétrasomique et intermédiaire chez cet hybride somatique interspécifique.

Au niveau intergénérique, la ségrégation allélique a été évaluée chez une descendance triploïde issue d'un croisement entre le pollen d'un hybride somatique intergénérique (*Citrus reticulata* Blanco) + *Poncirus trifoliata* (L.) Raf et des fleurs de pamplemoussier Chandler.

L'étude de la ségrégation allélique chez l'hybride inter générique a été plus complexe. En effet, les fréquences observées des génotypes de la descendance penchaient vers l'hypothèse d'une ségrégation intermédiaire. Les résultats obtenus ont fourni une évidence en faveur d'une ségrégation intermédiaire à tendance disomique.

Enfin, les descendance obtenues suite à trois croisements de type $2x \times 4x$ ont montré différents niveaux de ploïdie $2x$, $3x$ et $4x$. L'étude moléculaire a révélé que : 1/ Les individus tétraploïdes sont issus d'un gamète femelle non réduit et d'un gamète mâle diploïde. 2/ Les individus triploïdes proviennent de la fécondation d'un gamète femelle haploïde par un gamète mâle diploïde et 3/ Les individus diploïdes sont obtenus suite à la fécondation de deux gamètes haploïdes dont un provient de l'hybride somatique tétraploïde.

Mots clés : Agrumes, hybridation somatique, polyploïdie, ségrégation allélique, SSR, méiose, apomixie

Abstract

Citrus somatic hybridization via protoplast fusion has become an integral part of citrus variety improvement programs worldwide. Applications of somatic hybridization to citrus scion improvement include the production of quality tetraploid breeding parents that can be used in interploid crosses to generate seedless triploids. Applications of somatic hybridization to citrus rootstock improvement include the production of allotetraploid hybrids that combine complementary diploid rootstocks, and to combine citrus with sexually incompatible or difficult to hybridize genera that possess traits of interest for germplasm expansion.

The objective of this thesis is 1/ To determine the impact of somatic hybridization on the somatic hybrids phenotype especially on reproduction characteristics (Pollen fertility and Apomixis/polyembryony) 2/ To analyze the allelic inheritance in citrus intergeneric and interspecific somatic hybrids, and finally 3/ to establish the origin of ploidy variation in interploidal progenies involving citrus tetraploid somatic hybrids.

Analysis of reproduction characteristics in citrus somatic hybrids, generally, showed intermediate pollen characteristics to their fusion parents, while they showed an identical female fertility as one of their diploid parents. Concerning apomixis/polyembryony transmission, when compared to their diploid parents, all studied somatic hybrids were apomictic and polyembryonic. However, significative raise of zygotic rates in some were observed compared to their diploid parents. Moreover, embryony rates decreased significantly.

Cytogenetic analysis of citrus interspecific somatic hybrid meiosis displayed 11% of tetravalents and 76% of bivalents. Inheritance of the tetraploid hybrid was analyzed by genotyping the triploid progeny derived from a cross between a diploid pummelo and the tetraploid somatic hybrid. Markers segregation was largely compatible with tetrasomic and intermediate inheritance, with preferential pairing of homeologous chromosomes. However at the intergeneric level, obtained results support intermediate inheritance in a Citrus intergeneric somatic hybrid with occurrence of preferential pairing of homologous chromosomes.

Molecular analysis of interploidal crosses progeny implying citrus somatic hybrids revealed different ploidy levels and that tetraploids were issued from a diploid male and an unreduced female gamete. However, diploids were issued from a haploid female and a viable haploid male gamete coming from the tetraploid somatic hybrid.

Keywords: *Citrus*, polyploids, somatic hybridization, allelic inheritance, SSR, meiosis, apomixis

Résumé

Dans de nombreux bassins de production d'agrumes, la diversification des petits agrumes de type mandarinier sans pépins est au cœur des stratégies de segmentation du marché. Cette diversification variétale s'appuie largement sur la création d'hybrides triploïdes. En effet, grâce à la parthénocarpie des agrumes, la stérilité engendrée par la triploïdie n'affecte pas la fruidibondité et permet d'obtenir des fruits sans pépins.

Afin d'y parvenir, le CIRAD a mis en place un programme d'hybridation somatique permettant d'augmenter le nombre de parents tétraploïdes disponibles et ainsi contribuer à une meilleure définition des stratégies d'amélioration des agrumes triploïdes. Dans le but d'avoir une meilleure prévision du phénotype des hybrides polyploïdes en fonction de celui de leurs géniteurs, l'étude de la biologie de la reproduction de ces hybrides somatiques s'imposait.

Ce travail a pour objectif 1/ De comprendre la transmission du système de reproduction des hybrides somatiques d'agrumes en fonction de leurs parents diploïdes. 2/ De mieux prévoir la structure génétique des hybrides triploïdes lors des croisements $2x \times 4x$. 3/ De comprendre l'origine des variations de ploïdie observées dans les croisements entre diploïdes et tétraploïdes et d'évaluer la part de différents phénomènes tels que la gaméto-genèse et l'avortement précoce des embryons dans cette variabilité.

Ce travail représente la première étude sur la transmission du système de reproduction des hybrides somatiques. Les résultats obtenus montrent la conservation de certains caractères parentaux mais aussi de l'apparition de nouveaux phénotypes. L'ensemble des hybrides a montré une fertilité identique ou intermédiaire à celle du parent le moins fertile. Cependant, une diminution du degré de polyembryonie et une augmentation du pourcentage d'embryons d'origine zygotique ont été observées chez certains hybrides somatiques.

L'étude de la ségrégation allélique chez un hybride somatique interspécifique d'agrumes a été réalisée sur un hybride somatique inter spécifique tétraploïde d'agrumes entre la mandarine commune (*Citrus reticulata* Blanco) et le citron Eureka (*Citrus limon* (L.) Burm. F. L'étude cytogénétique a révélé la formation d'une majorité de bivalents (76%) avec une présence de mono et tétravalents (respectivement 4% et 11%). L'étude moléculaire de la ségrégation par marqueurs de type SSR polymorphes ne présentant aucun allèle en commun entre les trois parents, a été réalisée à l'aide de dix sept marqueurs moléculaires. L'analyse statistique des résultats obtenus montre une ségrégation tétrasomique et intermédiaire chez cet hybride somatique interspécifique.

Au niveau intergénérique, la ségrégation allélique a été évaluée chez une descendance triploïde issue d'un croisement entre le pollen d'un hybride somatique intergénérique (*Citrus reticulata* Blanco) + *Poncirus trifoliata* (L.) Raf et des fleurs de pamplemoussier Chandler.

L'étude de la ségrégation allélique chez l'hybride inter générique a été plus complexe. En effet, les fréquences observées des génotypes de la descendance penchaient vers l'hypothèse d'une ségrégation intermédiaire. Les résultats obtenus ont fourni une évidence en faveur d'une ségrégation intermédiaire à tendance disomique.

Enfin, les descendances obtenues suite à trois croisements de type $2x \times 4x$ ont montré différents niveaux de ploïdie $2x$, $3x$ et $4x$. L'étude moléculaire a révélé que : 1/ Les individus tétraploïdes sont issus d'un gamète femelle non réduit et d'un gamète mâle diploïde. 2/ Les individus triploïdes proviennent de la fécondation d'un gamète femelle haploïde par un gamète mâle diploïde et 3/ Les individus diploïdes sont obtenus suite à la fécondation de deux gamètes haploïdes dont un provient de l'hybride somatique tétraploïde.

Mots clés : Agrumes, hybridation somatique, polyploïdie, ségrégation allélique, SSR, méiose, apomixie